

**TUBERCULOSE CAPRINA:  
ESTUDO DE DOIS SURTOS EM  
TRÁS-OS-MONTES**

**TRABALHO DE NATUREZA PROFISSIONAL PARA A OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE ESPECIALISTA NO INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA  
NA ÁREA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS.**

**Hélder Miranda Pires Quintas**

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA**

**2013**



**ipb**

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA**  
Escola Superior Agrária

**TUBERCULOSE CAPRINA:  
ESTUDO DE DOIS SURTOS EM  
TRÁS-OS-MONTES**

**TRABALHO DE NATUREZA PROFISSIONAL PARA A OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE ESPECIALISTA NO INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA  
NA ÁREA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Hélder Miranda Pires Quintas**

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA**

**2013**

***Ao meu filho Martinho.***

## AGRADECIMENTOS

O documento que aqui se apresenta não é só meu, é o fruto do trabalho e colaboração de muitas pessoas às quais que sinto profundamente agradecido:

Um agradecimento institucional ao Sr. Presidente do Instituto Politécnico de Bragança Prof. Dr. Sobrinho Teixeira e ao Sr. Diretor da Escola Superior Agrária de Bragança Prof. Dr. Albino Bento.

Agradeço à Prof. Doutora Isabel Pires (UTAD) pela amizade, trabalho, toda a colaboração, disponibilidade, motivação e sugestões prestadas.

Ao Prof. Doutor Nuno Alegria (UTAD) , o meu reconhecimento por ter sido a primeira pessoa a ajudar-me no estudo deste foco. Agradeço-lhe o seguimento atento do desenrolar do trabalho, bem como as sugestões e comentários sempre importantes e motivadores.

À Doutora Ana Botelho (LNIV) pelo interesse, informações, disponibilidade e todo o apoio prestado.

Aos colegas da ESA-IPB Prof. Dr. Álvaro Mendonça e Prof. Dr. Ramiro Valentim por todo o apoio e ajuda prestada.

Aos colegas José Luis Fernandez Fernandez, médico veterinário na Galiza, e Susana Alves, actualmente na Universidade de León, pela ajuda e fornecimento de bibliografia de autores espanhóis. Sem eles não teria conseguido alguns documentos importantes para este trabalho.

À equipa de médicos veterinários da ACRIGA que acompanhou os casos Dra. Claudia Gomes, Dr. João Reis, Dra. Mónica Moura, Dra. Ana Margarida, Dr. Jorge Façanha. Colegas e amigos que tornam o nosso trabalho na OPP motivador.

Ao Leornado, ao Neves, D. Lúcia e ao saudoso Zé Maria, Técnicos de Pecuária da ACRIGA, que ajudaram durante as intradermotuberculizações e a colheita de material.

Aos vários alunos e alunas de Tecnologia Veterinária/Enfermagem Veterinária da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança que em estágio acompanharam os casos e participaram em algumas das necropsias e durante o abate, na recolha de informação relevante, preparação de amostras e das sempre importantes fotografias.

À Dra. Margarida França e ao Dr. Serra e restantes trabalhadores do Matadouro do Cachão por terem permitido acompanhar os abates sanitários o muito obrigado pela disponibilidade e ajuda.

À DIV-Bragança pelo acompanhamento prestado.

Aos donos dos rebanhos a minha homenagem pela dedicação que tinham aos seus animais.

Aos meus pais, à minha esposa e ao meu filho, porque sois tudo!

Quintas, H. "Tuberculose caprina: Estudo de dois surtos em Trás - os - Montes". Bragança, Portugal: 2013. Trabalho apresentado ao Instituto Politécnico de Bragança para a obtenção o título de Especialista na área de Ciências Veterinárias.

## RESUMO

Neste trabalho apresenta-se o estudo de dois casos de tuberculose caprina ocorridos em Trás – os – Montes. Inclui a descrição do quadro clínico, anatomopatológico e histopatológico, bem como alguns dados epidemiológicos relevantes.

O quadro clínico observado caracterizava-se pelo aparecimento de tosse seca acompanhada por emaciação progressiva com duração de 4 a 6 semanas causando elevada mortalidade (> 50%) durante período em que ocorreram os surtos. Na necropsia foram encontradas lesões granulomatosas compatíveis com tuberculose, e o exame bacteriológico mostrou a presença de *Mycobacterium caprae*. A prova intradermotuberculinização simples foi realizada na exploração 1 a 58 animais e a 133 na exploração 2, com 50 (86,2%) considerados positivos na primeira exploração e 124 (93,2%) na segunda: Com base estes dados foi realizado o abate total em ambos os efetivos. O acompanhamento do abate permitiu observar diferentes quadros anatomopatológicos: lesões de complexo primário, completo e incompleto, nos pulmões e intestino, bem como alguns casos de tuberculose generalizada. O estudo histológico revelou também diferentes quadros: por vezes, granulomas com necrose de caseificação e calcificação distrófica central, rodeada por infiltrado celular mononuclear e em outros casos, os granulomas apresentavam escassa necrose de caseificação ou mesmo ausência da mesma, com predomínio de células mononucleares e células gigantes de tipo Langhans. Nos casos em que a caseificação era mais evidente, na coloração Ziehl-Nielsen a quantidade de bacilos observada era maior.

Para além de uma análise crítica aos métodos de diagnóstico utilizados e às medidas de combate tomadas, sugerem-se ainda outras medidas de controlo e vigilância desta doença nos caprinos.

**Palavras – chave:** Tuberculose, caprinos, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*.

Quintas, H. "Tuberculosis in goats: study of two outbreaks in Trás-os-Montes". Bragança, Portugal: 2013. Paper presented at the Polytechnic Institute of Bragança to obtain the title of Specialist in Veterinary Science.

## **ABSTRACT**

In this dissertation we present a case study on clinical, pathological and histopathological findings as well as on some relevant epidemiological data found on two outbreaks of caprine tuberculosis occurred in Trás-os-Montes (Portugal).

The clinical symptoms characterized by initial dry coughing progressed during around 4-6 weeks and caused high mortality rates (>50%) of the affected goats during the period in which the outbreaks occurred. Granulomatous lesions characteristic of tuberculosis were found in several animals at post-mortem examination. *Mycobacterium caprae* was found in a lung sample sent to the LNIV-Lisbon. The single intradermal tuberculin test performed on 58 animals in goat herd 1 and 133 in goat herd 2 revealed, respectively, 50 (86.2%) and 124 (93.2%) animals positive for tuberculosis. Compulsory slaughter of all animals in the herds was ordered by DGAV (sanitary authority). The monitoring of slaughter allowed us to identify different pathological lesions: primary complex lesions (complete and incomplete) in lungs and/or intestines, as well as cases of generalized tuberculosis. Histopathological examination showed different types of tuberculosis granulomas ranging from granulomas with caseous necrosis and dystrophic calcification center, surrounded by cellular infiltration to granulomas with little caseous necrosis or lack thereof, with a predominance of cellular infiltration. When the caseous necrosis was more evident the number of acid-fast bacillus observed by Ziehl-Nielsen stain was substantially greater. In this work we also introduce a critical discussion of different issues related to diagnosis and we suggest several control measures for caprine tuberculosis.

**Keywords:** Tuberculosis, goats, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium bovis*,

## INDICE GERAL

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Indice Geral	v
Indice de tabelas	vii
Indice de figuras	ix
Abreviaturas	xi
Prefácio e Objectivos	xiii

### **Página**

## **PARTE I – Revisão Bibliográfica**

1. A Tuberculose	1
1.1. Introdução	1
1.2. O Género <i>Mycobacterium</i>	3
1.3. O Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
2. Tuberculose em caprinos	9
2.1. Importância na Saúde Publica	10
2.2. Patogenia da tuberculose caprina	13
2.2.1. Genoma e relações evolutivas do <i>M. bovis</i> e <i>M. caprae</i>	14
2.2.2. Patogenia	15
2.3. Epidemiologia da tuberculose caprina	22
2.3.1. Vias de infecção e transmissão	25
2.3.2. Situação da Tuberculose Caprina na Europa e no Mundo	28
2.4. Diagnóstico da tuberculose caprina	30
2.4.1. Diagnóstico <i>ante-mortem</i>	30
2.4.1.1. Diagnóstico clínico	30
2.4.1.2. Intradermotuberculinização	31
2.4.1.3. Prova do interferão gama	33
2.4.1.4. ELISA: <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>	34

	<b>Página</b>
2.4.2. Diagnóstico <i>post – mortem</i>	36
2.4.2.1. Diagnóstico anatomopatológico	36
2.4.2.2. Diagnóstico histológico	38
2.4.2.3. Diagnóstico bacteriológico	39
2.4.2.4. Provas de diagnóstico molecular	40
2.5. Controlo da tuberculose caprina	42
<b>PARTE II – Parte prática</b>	
3. Estudo de Caso	46
3.1. Caracterização da exploração	47
3.2. História clínica	49
3.3. Quadro clínico	49
3.3.1. Diagnóstico imagiológico	54
3.4. Diagnóstico laboratorial	55
3.5. Intradermotuberculinização simples	62
3.6. Exame pós – morte	75
3.7. Exame histopatológico	83
3.8. Controlo de foco	88
4. Conclusão e Considerações finais	93
Referências Bibliográficas	xiv

## INDICE DE TABELAS

	<i>Página</i>
<b>Tabela 1</b> – Classificação das micobactérias segundo Runyon.	5
<b>Tabela 2</b> - Bactérias do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	6
<b>Tabela 3</b> - Factores podem condicionar o desenvolvimento da infecção tuberculosa.	18
<b>Tabela 4</b> - Espectro imunopatológico das micobactérias.	20
<b>Tabela 5</b> – Resistência do <i>Mycobacterium bovis</i> .	27
<b>Tabela 6</b> – Tipos de lesões microscópicas encontrados na tuberculose caprina.	39
<b>Tabela 7</b> - Técnicas de biologia molecular utilizadas no âmbito da tuberculose animal.	41
<b>Tabela 8</b> – Informação epidemiológica relevante das explorações em estudo	46
<b>Tabela 9</b> – Taxa de mortalidade dos efetivos por escalões etários durante os períodos de acompanhamento do surto	52
<b>Tabela 10</b> – Resumo dos resultados laboratoriais e de campo na exploração 1.	56
<b>Tabela 11</b> – Diferenciação do <i>M. bovis</i> de outros membros do MTC	58
<b>Tabela 12</b> – Aplicações da genotipagem no âmbito da tuberculose animal.	58
<b>Tabela 13</b> – Principais vantagens e desvantagens do <i>spoligotyping</i> .	59
<b>Tabela 14</b> - Características bioquímicas e genéticas do <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> e <i>M. caprae</i>	61
<b>Tabela 15</b> - Resultados da IDT simples às 72 horas segundo critérios da OIE.	62
<b>Tabela 16</b> – Comparação de três critérios de interpretação da prova de IDT simples.	64
<b>Tabela 17</b> – Resultados da IDT simples às 72 horas comparando quatro critérios.	64
<b>Tabela 18</b> – Comparação de três critérios de interpretação da prova de IDT comparada.	65
<b>Tabela 19</b> – Sensibilidade relativa da IDT simples nos casos em estudo.	66
<b>Tabela 20</b> - Valores de sensibilidade e especificidade a diferentes provas de diagnóstico da tuberculose caprina.	67
<b>Tabela 21</b> – Causas de falsos negativos à IDT em caprinos	69
<b>Tabela 22</b> – Causas de falsos positivos à IDT em caprinos.	70

	<b>Página</b>
<b>Tabela 23</b> – Vantagens e desvantagens do teste do IFN- $\gamma$ face à IDT	73
<b>Tabela 24</b> – Prevalência de quadros lesionais de tuberculose ao abate.	75
<b>Tabela 25</b> – Animais com lesões de tuberculose por escalão etário.	82
<b>Tabela 26</b> – Razões do insucesso dos planos de erradicação da tuberculose animal	89
<b>Tabela 27</b> – Dificuldades e pontos – chaves do controlo da tuberculose caprina em Espanha	90

## INDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<b>Figura 1-</b> Evolução proposta para as micobacterias patogênicas a partir da estirpe ancestral do <i>M. canettii</i> .	15
<b>Figura 2-</b> Evoluções possíveis da tuberculose a partir do complexo primário.	17
<b>Figura 3-</b> Patogenia do <i>Mycobacterium bovis</i> .	21
<b>Figura 4 –</b> Transmissão do <i>M. bovis</i> , <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. avium</i> em ambiente doméstico.	22
<b>Figura 5-</b> Possíveis vias de transmissão do <i>M. bovis</i> entre os animais domésticos, silváticos e o homem.	26
<b>Figura 6-</b> Quadro lesional da tuberculose caprina.	36
<b>Figura 7 –</b> Método de Bang para controlo da tuberculose animal.	44
<b>Figura 8 –</b> Imagens das explorações em estudo.	46
<b>Figura 9-</b> Localização das explorações de caprinos em estudo.	48
<b>Figura 10 –</b> Prevalência da tuberculose bovina em Trás-os-Montes e em Portugal desde o ano 2000.	48
<b>Figura 11-</b> Cronograma da história clínica dos efetivos.	49
<b>Figura 12 –</b> Exame clínico de um caprino: auscultação, medição da temperatura corporal e avaliação da condição corporal.	50
<b>Figura 13-</b> Evolução da população de caprinos nos efetivos	51
<b>Figura 14 –</b> Area de exploração ecográfica do tórax nos caprinos e ecografo utilizado	54
<b>Figura 15 –</b> Imagem ecográfica do pulmão e corte à necropsia do lobo pulmonar correspondente.	55
<b>Figura 16-</b> Principais etapas para o isolamento e identificação de micobactérias no Serviço de Diagnóstico Bacteriológico do LNIV.	57
<b>Figura 17–</b> Leitura dos resultados da IDT	63
<b>Figura 18 –</b> Valores de sensibilidade e especificidade de diversas provas diagnósticas aplicadas ao diagnóstico da tuberculose caprina.	74
<b>Figura 19-</b> Quadros lesionais de tuberculose encontrados à necropsia.	76
<b>Figura 20 -</b> Lesões de complexo primário intestinal: intestino e gânglio linfático mesentérico.	77

	<b>Página</b>
<b>Figura 21</b> – Tuberculose perlácea das serosas.	77
<b>Figura 22</b> – Quadros lesionais de tuberculose pulmonar caprina e linfadenite granulomatosa: lesões caseo-calcárias nos gânglios mediastínicos.	78
<b>Figura 23</b> – Tuberculose miliar e de grandes nódulos no fígado.	79
<b>Figura 24</b> – Tuberculose esplénica: miliar e de grandes nódulos.	80
<b>Figura 25</b> – Quadros lesionais de tuberculose mamária.	80
<b>Figura 26</b> – Quadros lesionais de tuberculose: no rim; e no útero e ovários.	81
<b>Figura 27</b> - Distribuição das lesões de tuberculose nos órgãos dos caprinos necropsiados.	81
<b>Figura 28</b> – <b>A:</b> Pneumonia granulomatosa compatível com tuberculose (H&E). <b>B:</b> Pneumonia granulomatosa com predomínio de lesões exsudativas (H&E).	83
<b>Figura 29</b> – <b>A:</b> Linfadenite granulomatosa compatível com tuberculose nos linfonodos brônquicos.(H&E). <b>B:</b> Linfadenite granulomatosa no linfonodo mesentérico. <b>C:</b> Pormenor da imagem anterior (H&E).	84
<b>Figura 30</b> – Hepatite granulomatosa compatível com tuberculose (H&E).	84
<b>Figura 31</b> – <b>A:</b> Esplenite granulomatosa (H&E). <b>B:</b> Granulomas esplénicos sem necrose de caseificação e abundantes células epitelióides e células gigantes de Langhans (H&E).	85
<b>Figura 32</b> – Mamite granulomatosa.(H&E).	85
<b>Figura 33</b> – <b>A:</b> Enterite granulomatosa.(H&E) <b>B:</b> Nefrite granulomatosa; <b>C e D:</b> Traqueíte granulomatosa ; <b>E:</b> Metrite granulomatosa.	86
<b>Figura 34</b> – Bacilos álcool-ácido resistentes (Ziehl-Neelsen).	87
<b>Figura 35</b> – Modelo de programa sanitário contra a tuberculose caprina	91
<b>Figura 36</b> – Possíveis fontes de transmissão no surto provocado por <i>Mycobacterium caprae</i> no rebanho de caprinos em estudo.	95

## ABREVIATURAS

%- Percentagem.

®- Marca registada.

**AB-P-** Avidina-Biotina-Peroxidase.

**ACRIGA-** Associação de Criadores de Gado e Agricultores.

**ADN-** Ácido desoxirribonucleico.

**ARN-** Ácido ribonucleico.

**ARNm-** ARN mensageiro.

**ARNr-** ARN ribossomal.

**B.O.R.M.-** Boletín Oficial de la Región de Murcia.

**B3-** Efectivo indemne relativamente à brucelose.

**BAAR-** Bacilos alcool –ácido-resistentes.

**BCG-** Bacilo Calmette-Guerin.

**CAEV-** Caprine arthritis-encephalitis vírus.

**CE-** Conselho Europeu.

**CEE-** Comunidade Económica Europeia.

**cm-** centímetros.

**CPP-** Complexo Pulmonar Primário.

**CPPinc.-** CPP incompleto.

**DGAV –** Direcção Geral de Alimentação e Veterinária

**DIV –** Divisão de Intervenção Veterinária

**DVR-** Direct variant repeat.

**EFSA-** European Food Safety Agency.

**ELISA-** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

**FAO-** Food and Agriculture Organization.

**G+C-** Guanina + Citosina.

**HCl-** Ácido Clorídrico.

**HIV-** Human imunodeficiency vírus

**IDT-** Intradermotuberculinização.

**IL-** Interleucina.

**INF-  $\gamma$ -** Interferão gama.

iNOS- Oxido nítrico sintase (isoforma indutível)

**IS-** Insertion sequence.

**JORF-** Journal Officiel de la République Française.

**L-J-** Meio de cultura de Lowenstein – Jensen.  
**LNIV-** Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.  
**Map-** *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.  
**MAC-** *Mycobacterium avium complex*.  
**MHz-** Mega-hertz  
**MIRU-** Mycobacterial Interspersed Repetitive Units.  
**MTC-** *Mycobacterium tuberculosis complex*.  
**Na OH-** Hidróxido de sódio.  
nº.- número.  
°C- graus Celsius.  
**OD-** Optical density.  
**OIE-** Office International des Epizooties .  
**OPP-** Organização de Produtores Pecuários.  
**pb-** pares de bases  
**PCR-** Polimerase Chain Reaction.  
**PGRS-** Polymorphic GC-rich Sequence.  
**PNETB-** Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina.  
**PPD-** Protein Purified Derivative.  
**PPE-** Prolina-Prolina-Glutamato.  
**PZA-** Pirazinamida.  
**RD-** Regions of difference.  
**RFLP-** Restriction Fragment Length Polymorphism.  
**SIDA-** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.  
**TCH-** Hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico.  
**UFC-** Unidade Formadora de Colónias.  
**VNTR-** Variable Number Tandem Repeat.  
**WHO –** World Health Organization.  
**ZN-** Ziehl – Neelsen.

Abreviatura de género de microrganismos:

**M.-** *Mycobacterium*.

## PREFÁCIO e OBJECTIVOS

A tuberculose é uma grave doença infecciosa que atinge várias espécies animais e o homem, incluída pela Organização Mundial de Saúde Animal na sua lista B. A importância dos animais domésticos como reservatórios de micobactérias capazes de infectar e provocar doença grave na espécie humana levou a que se iniciassem programas de erradicação da doença, especialmente em bovinos, baseados numa estratégia de detecção e abate (Cousins, 2001), que originaram uma descida da prevalência até valores inferiores a 1% no nosso país. Contudo, a capacidade de *Mycobacterium bovis* para infectar outras espécies animais, tanto domésticas como silváticas, pode comprometer o sucesso dos planos de erradicação (Costello et al., 1999; Zanella et al., 2008). Nos caprinos, espécie animal onde classicamente a infecção era rara, tem aumentado a frequência do isolamento de micobactérias patogénicas (Parra et al., 2005; Prodingier et al., 2005). As características genéticas de algumas estirpes isoladas em caprinos mostraram-se divergentes daquelas encontradas em *M. bovis*, o que levou a que fosse proposta a sua classificação como *M. tuberculosis* subsp. *caprae* (Aranaz et al., 1999) e mais recentemente como *M. caprae* (Aranaz et al., 2003).

Os **objectivos** que se pretendem alcançar com este trabalho são os seguintes:

- Revisão bibliográfica da etiologia, patogenia, epidemiologia, métodos de diagnóstico e de controlo da tuberculose caprina;
- Estudo de dois focos de tuberculose em caprinos ocorridos na área de intervenção sanitária da OPP (Organização de Produtores Pecuários) da ACRIGA – Associação de Criadores de Gado e Agricultores. O primeiro no concelho de Bragança em 2007/2008 e o segundo no concelho de Macedo de Cavaleiros em 2012. Com o relato desta experiência pretendemos sensibilizar os diferentes intervenientes na área da sanidade animal para a importância que a infecção em caprinos pode assumir, e que escapa às medidas de controlo e erradicação da tuberculose atualmente em vigor no nosso país. A descrição pormenorizada do quadro clínico, anatomopatológico e histopatológico encontrados poderá também contribuir para que sejam tomadas medidas de epidemiovigilância específicas nesta espécie animal onde o diagnóstico da doença não é realizado de forma sistemática.

## 1. A Tuberculose

### 1.1. Introdução

A tuberculose é uma doença que assola a humanidade desde a pré-história (Taylor *et al*, 2007a), existem descrições dela em papiros e foram mesmo encontradas lesões nodulares típicas em algumas múmias egípcias. Esta afecção normalmente evolui de forma crônica e pode afetar tanto o homem como animais domésticos e selvagens (Martín & León, 1998). Ao longo dos séculos sofreu várias designações como tísica, tísica perlacea ou pulmonar, doença ganglionar (“os *gânglios*”), mal francês, mal perlaceo e escrofulose (Zarzuelo, 1981).

A primeira referência de tuberculose animal data do ano 40, quando o escritor agrônomo romano Lucius Junius Moderatus “Columella” relata a tuberculose pulmonar em bovinos (Martín & León, 1998). Desde então conhece-se a sua existência na bacia mediterrânea de onde se difundiu para toda a Europa e desde aí para o resto do mundo por exportações de bovinos feitas essencialmente a partir de Inglaterra e da Holanda (Garcia & Gutierrez, 1996).

Morton em 1689 considerava sinónimos a existência de nódulos e a tuberculose. A sua natureza infecciosa foi comprovada pela primeira vez por Klenke em 1843 através da demonstração da sua transmissão experimental (Zarzuelo, 1981). Klenke, um médico de Braunschweig (Alemanha), já em 1797 associara o consumo de leite de vaca com o aparecimento de lesões tuberculosas no homem. Mas apenas em 1868, Villemin confirmou a tuberculose como uma doença transmissível entre o homem e os animais e vice versa, conseguindo causar a doença tanto em coelhos como em cobaios por inoculação de material patogénico proveniente do homem e de animais. Assim se demonstrou também que a tuberculose no homem e o mal perlaceo nos bovinos eram idênticos e eram produzidos pelo mesmo agente infeccioso confirmando as suspeitas de Gurlt (1831), Hering (1849) e Fuchs (1859), que consideravam a tuberculose bovina essencialmente igual à tuberculose pulmonar humana (Martín & León, 1998).

Em 1882, Robert Koch demonstrou a etiologia bacteriana da doença ao descobrir o agente infeccioso da tuberculose humana o *Mycobacterium tuberculosis*, também designado em sua homenagem bacilo de Koch, corando-o pela fucsina-anilina e isolando-o em meio de cultura em 1884 (Pritchard, 1988). Na tentativa falhada de desenvolver uma vacina para a tuberculose Koch cria em 1890 um

meio de diagnóstico para esta doença a tuberculina (Martín & León, 1998). Smith em 1897 diferencia os bacilos humano, bovino e aviário (Pritchard, 1988).

A Finlândia foi o primeiro país a desenvolver uma campanha de erradicação da tuberculose bovina em 1889. A primeira tentativa para evitar o contágio da tuberculose bovina a humanos deu-se dez anos mais tarde quando, em Inglaterra, a Royal Commission on Tuberculosis, considerou as leitarias, os talhos e estábulos como locais de risco potencial para a Saúde Pública, proibindo a venda de leite e carne proveniente de vacas infectadas (Martín & León, 1998).

Desde então, principalmente nos países industrializados, desenvolveram-se planos de erradicação e controlo da tuberculose animal, sobretudo na espécie bovina. O envolvimento de grandes recursos humanos e financeiros conduziu a resultados satisfatórios no controlo da doença, mas apenas alguns países do norte da Europa lograram a obtenção do estatuto de “oficialmente indemne de tuberculose bovina”, embora com o surgimento de casos esporádicos em áreas bem definidas (Garcia, 1996; WHO, 2007). No contexto de toda a União Europeia, na última década os dados disponíveis apontam para um ligeiro aumento da prevalência da tuberculose em bovinos apesar da diminuição do número de explorações positivas nos países não indemnes, como é o caso de Portugal (WHO, 2007, DGAV, 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde a tuberculose como zoonose, nomeadamente causada por *Mycobacterium bovis* (agente da tuberculose bovina), é preocupante em todo o mundo, sobretudo nos países em vias de desenvolvimento, onde o conhecimento do problema é escasso e a necessidade de melhoria dos aspectos de saúde pública veterinária é enorme (WHO, 1993). Aliado a estes factos, em muitos destes países de África, Ásia, América Central e do Sul a tuberculose bovina é enzoótica (Enarson, 2006).

A tuberculose humana é na atualidade a primeira causa de morte no mundo por uma doença curável e, ao contrário do que se pensou há algumas décadas, verifica-se hoje um aumento da sua incidência em muitos países, estimando-se que 1/3 da população mundial esteja infectada de forma latente. Em 2005 registaram-se 8,8 milhões de novos casos e 1,6 milhões de mortes, sobretudo na Ásia e África Sub-sahariana (WHO, 2007b). Mesmo nos países industrializados, como Portugal, têm surgido sinais preocupantes de recrudescimento, pelo aumento da incidência da tuberculose nos grandes centros urbanos (Duarte, 2008).

As manifestações subclínicas ou crónicas da doença, o vasto leque de sintomas, as dificuldades no isolamento do agente etiológico, a relativa baixa eficácia das vacinas disponíveis, o número crescente de estirpes multirresistentes, a correlação positiva com a infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana), as condições sócio-economias precárias, bem como os fluxos migratórios oriundos de países com elevadas prevalências, dificultam o controlo e erradicação da tuberculose (Falzon & Ait-Belghiti, 2007; Duarte, 2008).

Nos caprinos, a doença ocorre de forma semelhante à observada nos bovinos no que diz respeito à etiopatogenia, sintomatologia, lesões anatomo-patológicas, prevalência e aspectos epidemiológicos e zoonóticos (Bernabé *et al*, 1991a; Bernabé *et al*, 1991b), existindo contudo poucos dados sobre a doença. As escassas tentativas de controlo em países como a Espanha, França, Grécia e África do Sul basearam-se até hoje, nos modelos aplicados à espécie bovina, embora sem resultados publicados (Garcia, 1996).

## **1.2. O género *Mycobacterium***

A tuberculose é causada por bactérias do género *Mycobacterium*, o único da família *Mycobacteriaceae*, pertencente à ordem *Actinomycetales* e ao filo *Actinobacteria* (Rastogi & Sola; 2001).

O género *Mycobacterium* engloba mais de 120 espécies reconhecidas actualmente (Tortoli, 2006) e é formado por bactérias aeróbias, imóveis, não capsuladas e não formadoras de esporos. A maioria das espécies, apresenta uma morfologia bacilar ou cocobacilar. Os bacilos são finos, rectos ou ligeiramente encurvados, apresentando-se, isolados, aos pares ou em pequenos agrupamentos de bacilos paralelos (Sousa *et al*, 2000). A temperatura óptima de crescimento varia entre 30 e 45°C (Rastogi & Sola; 2001) e o seu tamanho entre 0,2-0,6 x 1,0 -10 µm. O seu ADN possui um elevado conteúdo em guanina e citosina (G+C entre 62 e 70%) (Gutiérrez & Juste; 1996).

Uma característica única, em termos de procariotas, das micobacterias é a complexidade da sua parede celular extremamente rica em lípidos, incluindo ceras, representando cerca de 40% do seu peso seco (normalmente representa apenas 5% nas Gram positivas ou 20 % nas Gram negativas) (Gutiérrez & Juste, 1996). Os

lípidos com maior importância são: (a) ácidos micólicos, ácidos gordos – beta – hidroxi, de elevado peso molecular, com 60-90 átomos de carbono, responsáveis pela ácido-resistência, que se discutirá em seguida; (b) micosídeos, responsáveis pela resistência a enzimas solúveis em água, antibióticos e desinfetantes; e cera D, que aumenta a resposta imunitária e, em conjunto com outras proteínas, induzem a hipersensibilidade retardada; e (c) glicolípidos, responsáveis pela toxicidade, resposta granulomatosa e sobrevivência das micobactérias fagocitadas (Carter, 1988). Este alto conteúdo em ácido micólico e lípidos impede a entrada dos corantes tradicionalmente utilizados nos métodos de Giemsa e Gram (Sousa *et al*; 2000). Embora possam ser consideradas citoquimicamente Gram-positivas (Quinn *et al*; 2005) tem em comum com as Gram negativas uma camada de peptidoglicano e uma camada externa lipídica, mas sem possuir lipopolissacarido endotóxico (Duarte, 2008).

A constituição da parede celular é importante para as micobactérias sob o ponto de vista patogénico (capacidade de sobreviver e multiplicar-se no interior dos macrófagos), epidemiológico (resistência à dessecação e elevada taxa de sobrevivência no meio ambiente) e taxonómico (álcool-ácido-resistência) (Martín & León, 1998). A álcool-ácido-resistência significa que os lípidos da parede celular ligam-se à fucsina carbólica que não é removida pelo álcool-ácido usado no método de coloração Ziehl-Neelsen (ZN). Os bacilos, que coram de vermelho por este método são designados ZN – positivos ou álcool-acido - resistentes (Quinn *et al*; 2005) Embora não seja patogénica das micobactérias esta característica muito importante em termos de identificação laboratorial (Sousa, 2000).

A parede celular confere, ainda, a capacidade de crescer como colónias hidrofóbicas em meios de cultura sólidos ou como filamentos de tipo fungico em meio líquido. Este tipo de crescimento filamentoso é o responsável pelo prefixo “mico-“, do grego *Myces*, que significa fungo (Gutiérrez & Juste, 1996).

As micobactérias tem exigências nutritivas particulares, pelo que não se desenvolvem nos meios de cultura tradicionais utilizados habitualmente para a maioria das outras bactérias. Um dos meios mais utilizados é o meio de Lowenstein – Jense (L-J), à base de ovo e contendo verde de malaquite como agente inibidor. Neste meio, bem como noutros meios apropriados, as micobactérias desenvolvem-se, em geral, lentamente, sendo necessária uma incubação prolongada, de duas a seis semanas, para que se formem as colónias características. O aspecto das colónias é diferente consoante as espécies, tendo as colónias de *M. tuberculosis* aspecto rugoso (“colónias

em couve flor”). Por sua vez *M. avium* forma colónias lisas neste meio de cultura. Algumas espécies saprófitas desenvolvem-se em cerca de uma semana (Sousa *et al*, 2000), outras como *M. avium paratuberculosis* demora cerca de 6 meses (Duarte, 2008) ou podem mesmo não se cultiváveis em meios artificiais como no caso de *M. leprae* (Sousa *et al* 2000; Duarte, 2008).

Existem hoje novas tecnologias, como os métodos radiométricos e fluorométricos, que utilizam meios de cultura líquidos e com os quais é possível detectar o desenvolvimento microbiano em cerca de 7 a 14 dias e, mais recentemente, os métodos genéticos (Sousa *et al* 2000).

Um dos critérios utilizados na classificação das micobactérias é a velocidade de crescimento, um aspecto fenotípico que se pode associar às características específicas do ARN ribossomal. Segundo este critério podem formar-se dois grandes grupos: as micobactérias de crescimento rápido, que formam colónias visíveis a partir de inóculos em menos de 7 dias, uma vez que não requerem fatores especiais de crescimento (ex. espécies saprófitas), e as micobactérias de crescimento lento, que necessitam de 7 dias ou mais, e requerem fatores especiais de crescimento (ex. espécies patogénicas) (Gutiérrez & Juste; 1996).

**Tabela 1** – Classificação das micobactérias segundo Runyon (Baseado em Carter, 1988).

<b>Grupo I:</b> Fotocromogéneas	Crescimento lento	Apenas produzem colónias pigmentadas após exposição à luz.	Ex: <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> .
<b>Grupo II:</b> Escotocromogéneas		Produzem pigmentos na ausência de luz.	Ex: <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> .
<b>Grupo III:</b> Não cromogéneas		Produzem pouco ou nenhum pigmento com exposição à luz.	Ex: <i>M. intracellulare</i> , <i>M. avium avium</i> , <i>M. avium paratuberculosis</i> .
<b>Grupo IV:</b> Pigmentação variável	Crescimento rápido		Ex: <i>M. fortuitum</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> .

Outro critério importante para a classificação das micobactérias é a produção de pigmentos. Runyon (1959) propôs a sua divisão em quatro grupos segundo a velocidade de crescimento e a produção de pigmentos (Tabela 1).

Os membros destes grupos, à exceção de *M. avium*, não são causa de doenças importantes em animais, mas podem sensibilizar os animais dificultando o diagnóstico alérgico (Carter, 1988). Apesar de manter alguma utilidade, esta classificação apresenta algumas limitações, como sejam apenas se basear em características culturais e não envolver o conceito de patogenicidade, nem o significado clínico das várias espécies (Sousa *et al*, 2000).

As bactérias do género *Mycobacterium* ocupam um lugar importante na microflora ambiental, sendo isoladas principalmente a partir de amostras de solo, e também de água doce e salgada. Esta ubiquidade permite um contato frequente das micobactérias com o homem e os animais, mas felizmente a maior parte delas não tem capacidade patogénica. H. David propôs a classificação clínica das micobactérias em três grupos: (1) os agentes patogénicos estritos; (2) os potencialmente patogénicos ou oportunistas, espécies normalmente saprófitas que em determinadas circunstâncias se podem tornar patogénicas, como é o caso do Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (ou MAC, *Mycobacterium avium complex*), que compreende bactérias da água, solo, plantas, alimentos e animais que causam infecções oportunistas em pessoas imunocomprometidas; e (3) as espécies saprófitas, não patogénicas ou raramente patogénicas (Sousa *et al*, 2000).

Dentro dos agentes patogénicos estritos podem destacar-se *M. tuberculosis* e *M. africanum*, que causam tuberculose humana; *M. bovis*, cujos hospedeiros são alguns ruminantes (bovinos, cervídeos, caprinos, entre outros) e *M. leprae*. (Martín & León, 1998; Sousa *et al*, 2000)

No âmbito da medicina veterinária, existem várias micobactérias que infectam mamíferos, aves, anfíbios, peixes e répteis (Quinn *et al*; 2005). Estas espécies são relativamente específicas para o seu hospedeiro, mas podem causar infecção ou doença em outros hospedeiros ocasionais, como por exemplo *M. bovis*, que pode afetar humanos tal como *M. tuberculosis* pode afetar animais. No entanto, a especificidade referida faz com que a capacidade que estas bactérias têm para produzir doença num hospedeiro não específico seja menor, necessitando de outros fatores, como a imunossupressão, para poderem causar doença (Martín & León, 1998).

## 1.2. O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Dada a proximidade genética entre algumas micobactérias, torna-se difícil uma diferenciação clara entre as espécies pelos métodos laboratoriais tradicionais. Este é o caso das bactérias do denominado complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC, *Mycobacterium tuberculosis* complex), quer pela semelhança entre o tipo de lesões tuberculosas que provocam nos hospedeiros, quer pela semelhança fenotípica das suas culturas (Tabela 2) (Gutiérrez & Juste; 1996).

**Tabela 2-** Bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Gutiérrez & Juste; 1996; Quinn *et al*, 2005; Duarte, 2008)

Espécie	Hospedeiros principais	Hospedeiros ocasionais	Observações
<i>M. tuberculosis</i>	Homem, primatas em cativeiro	Cão, gato, psitacídeos, canários	Agente da tuberculose humana.
<i>M. bovis</i>	Bovinos	Veados, texugos, humanos, cães, gatos, caprinos, ovinos e outros mamíferos	Tuberculose em animais domésticos e selvagens. Espécie com o leque mais vasto de hospedeiros. Sujeito a planos de erradicação da tuberculose bovina em vários países.
<i>M. africanum</i>	Homem		Tuberculose (regiões de África).
<i>M. microti</i>	Ratos silvestres ( <i>Microtus agrestis</i> )	Outros mamíferos	Pouco frequente. Baixa patogenicidade. Com potencial para utilização em vacinas.
<i>M. canettii</i>	Homem		Encontrada em África é a espécie geneticamente mais divergente dos restantes membros do MTC e filogeneticamente mais próxima da espécie ancestral do MTC.
<i>M. pinnipedii</i>	Focas	Mamíferos de parques zoológicos;  Homem	Isolada pela primeira vez na América do Sul em pinípedes ( <i>Arctophalus australis</i> , <i>Arctocephalus tropicalis</i> , <i>Otaria flavescens</i> ).
<i>M. caprae</i>	Caprinos e bovinos	Homem, porcos, dromedários, bisontes.	Em Portugal o seu isolamento tem o mesmo significado que o <i>M. bovis</i> em termos de medidas sanitárias a adoptar nas explorações afetadas.

Atualmente incluem-se no MTC as seguintes espécies, com características fisiológicas, de virulência e afinidade pelos hospedeiros próprias: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* e *M. caprae* (tabela 2). Podem ainda considerar-se como pertencentes a este grupo as linhagens “dassie bacillus” (do daimão) e “oryx bacillus” (do antilope) (Duarte, 2008).

Para além de provas bioquímicas, existem várias técnicas moleculares que atualmente são muito úteis para diferenciar as micobactérias. A taxonomia molecular, baseada no estudo das moléculas portadoras de informação genética, permite conhecer melhor as espécies bacterianas e as suas relações filogenéticas. Como são disso exemplo, o estudo do conteúdo em G+C, a homologia ADN-ADN (determinação da percentagem de ADN de organismos diferentes que hibridam entre si) ou técnicas, mais recentes, alternativas a estas, como as endonucleases de restrição de ADN, sondas de ADN e a utilização das diferentes técnicas de PCR (*polimerase chain reaction*) (Gutiérrez & Juste; 1996; Quinn *et al*, 2005).

No que diz respeito aos membros do MTC, os estudos efetuados indicam que a homologia do seu ADN é de 99,9% (Sreevatsan *et al*, 1997). Habitualmente valores superiores a 60-70% determinam a consideração de organismos como pertencentes à mesma espécie (Gutiérrez & Juste; 1996), pelo que a classificação utilizada pode ser considerada artificial e, de facto, tratam-se de variantes de uma mesma espécie (Grange *et al*, 1996). Os membros do MTC possuem ainda sequências idênticas do gene do ARNr 16S (Hughes *et al*, 1993).

Um caso particular é o do Bacilo Calmette-Guerin (ou BCG), cuja origem remonta a 1908 quando, Albert Calmette, médico, e Camille Guerin, veterinário, iniciaram o processo de atenuação de uma estirpe isolada a partir de uma vaca com tuberculose. Para o conseguir, realizaram 230 passagens seriadas dessa estirpe num meio de cultura à base de batata com adição de bÍlis. Em 1919 concluíram o processo obtendo uma estirpe avirulenta para cobaios, coelhos, vacas e cavalos. O BCG é utilizado como vacina contra a tuberculose em humanos e não pode ser considerado uma espécie diferente, uma vez que se trata de uma estirpe atenuada que deriva de uma estirpe patogénica de *M. bovis*, apesar de possuir características próprias que o diferenciam claramente dos restantes membros do MTC (Gutiérrez & Juste; 1996).

## 2. Tuberculose em caprinos

Alguns autores consideraram durante muito tempo os caprinos refratários à tuberculose. No entanto, o número de casos que foram sendo descritos e a gravidade com que se estabelece a infecção em alguns desses casos, provaram que os caprinos estão longe de ser hospedeiros refratários a esta doença.

No que diz respeito à tuberculose caprina, já em 1884 Koch descreveu um caso de tuberculose numa cabra que apresentava cavernas pulmonares e lesões caseosas nos gânglios linfáticos bronquiais, fígado e baço (Garcia & Gutierrez, 1996).

*Mycobacterium bovis* está frequentemente associado a tuberculose pulmonar em caprinos. Embora com menor frequência, *Mycobacterium avium* pode ser isolado em lesões intestinais e *Mycobacterium tuberculosis* pode provocar quadros de tuberculose generalizada (Vera *et al*, 1989; Bernabé *et al*, 1991a; Smith & Sherman, 2009). Recentemente na Europa, algumas estirpes de *M. tuberculosis* isoladas em caprinos, bovinos, animais selvagens e em humanos, com múltiplas inserções da sequência IS6110 foram reconhecidas como uma nova espécie, denominada *Mycobacterium caprae* (Aranaz *et al*, 2003; Prodinger *et al*, 2005). Sob esta denominação foram incluídas estirpes anteriormente identificadas como *M. bovis* subsp. *caprae* ou *M. tuberculosis* subsp. *caprae*, o que coloca em questão a identificação das espécies em toda a bibliografia anterior (Smith & Sherman, 2009). *M. bovis* e *M. caprae* são hoje reconhecidos como os principais agentes etiológicos de tuberculose caprina (Bezós *et al*, 2012). Outro bacilo, *Mycobacterium kansasii*, foi isolado a partir de gânglios linfáticos mediastínicos de uma cabra durante a campanha de erradicação da tuberculose caprina nas ilhas Canárias (Acosta *et al*, 1998).

A tuberculose caprina tem sido descrita nos cinco continentes, com diagnóstico estabelecido por exame macroscópico em necrópsias e em matadouros ou pela tuberculinização (Benesi *et al*, 2007).

Alguns autores referem que a infecção em cabras é pouco frequente, mesmo em países com elevadas prevalências de tuberculose suína e bovina (Smith & Sherman, 2009). Contudo os caprinos são tanto ou mais sensíveis que os bovinos à tuberculose, como provam os vários surtos de tuberculose em Espanha, que cursaram com quadros clínico e lesional graves. Também em infecções experimentais, os caprinos apresentaram lesões mais extensas que os bovinos. Assim, na maioria dos

países, a limitada prevalência e gravidade das infecções, podem explicar-se pela existência de uma delimitação marcada entre a criação de bovinos e de caprinos bem como, à escassa importância da caprinicultura (intensiva) em alguns desses países (Garcia e Gutiérrez, 1996).

## 2.1. Importância em Saúde Pública

Recentemente, Taylor e colaboradores (2007a), recuperaram ADN de *Mycobacterium bovis* a partir de ossos humanos do período neolítico (“idade do ferro”) com lesões de tuberculose, o que indica o carácter ancestral desta zoonose.

Quando se referem à tuberculose como zoonose, a esmagadora maioria dos autores, referem-se à tuberculose bovina e ao seu principal agente, *Mycobacterium bovis*, dada a indiscutível importância que esta doença e agente etiológico têm. O avolumar crescente de descrições de tuberculose em outras espécies, nomeadamente nos caprinos, a que este estudo se junta, chama a atenção para o impacto que outros animais e micobactérias podem ter para a saúde pública.

Os caprinos podem ser uma fonte de contágio de tuberculose para o homem, já que *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae*, agentes etiológicos comuns da tuberculose caprina, já foram isolados em casos graves de tuberculose (Romero *et al*, 2006; Cvetnic *et al*, 2007). Garcia e Gutiérrez (1996) encontraram em estudos de RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”), variantes de *M. bovis* de origem caprina em casos de tuberculose humana, identificando mesmo por rastreio epidemiológico os rebanhos de origem.

A tuberculose é transmitida dos animais para o homem directamente por via aerógena ou indirectamente através do leite (WHO, 1994).

*Mycobacterium bovis* é o agente mais frequente de tuberculose humana com origem animal. Desde sempre, provocou um grande número de casos de tuberculose humana, especialmente quadros intestinais em crianças por ingestão de leite contaminado (sobretudo de origem bovina). Com a generalização da pasteurização do leite e o desenvolvimento de planos de erradicação de tuberculose bovina, a ocorrência desta zoonose decaiu radicalmente (Cataldi e Romano, 2007). Actualmente este agente tem sido associado a um maior número de lesões extra-pulmonares comparativamente ao *M. tuberculosis*, o que indica uma maior frequência de infecção

por via digestiva, com exceção dos casos de doença profissional em trabalhadores de matadouros ou de explorações bovinas, pela transmissão ser por via respiratória (O'Reilly e Daborn, 1995; Duarte, 2008). A prevalência de tuberculose humana devida a *M. bovis* é, por isso, muito baixa nos países industrializados. Passou de 10 a 40% no início do século XX para os cerca de 1 % dos casos totais na atualidade. Nos nossos dias os casos descritos ocorrem sobretudo em pessoas idosas por re-ativação de infecções antigas (adquiridas antes da generalização da pasteurização do leite) e em imigrantes oriundos de países onde a tuberculose bovina não foi erradicada (Thoen *et al* 2006; Rua-Domenec *et al*; 2006), em indivíduos co-infectados com o HIV (Aguilar *et al*; 2007), e associado ao consumo de leite cru em algumas zonas rurais (Gibson *et al*, 2004).

A Alemanha constitui um caso particular relativamente a *M. caprae*, já que este agente foi isolado em 31% dos casos de tuberculose humana associada à transmissão por animais (Kubica *et al*, 2003). Este agente é mesmo a principal causa de tuberculose humana e animal em muitas regiões da Europa Central (Prodinger *et al*, 2002). Esta proporção do *M. caprae* como agente zoonótico não encontra paralelo em nenhum outro lugar. Em muitos outros países não foi isolado em humanos (ex. França, Inglaterra, Irlanda, America do Sul), mas, em contrapartida, os casos descritos em Espanha (Gutierrez *et al*, 1997), na Áustria (Prodinger, 2002) e na Croácia (Cvetnic *et al*, 2006) demonstraram a importância deste agente em determinadas zonas do globo. Em Portugal não existem números oficiais relativos aos casos de tuberculose humana causada quer por *M. bovis* (David *et al*, 2005) como por *M. caprae*.

Nos países em vias de desenvolvimento, a importância da tuberculose como zoonose é difícil de avaliar, não só pela falta de meios de diagnóstico como também pelo caráter enzoótico da tuberculose (bovina) e a falta de medidas de controlo e erradicação, bem como pela elevada prevalência de infecções pelo HIV (Duarte, 2008). Alguns dos dados disponíveis indicam percentagens consideráveis de casos de tuberculose humana causada por *M. bovis*, como são disso exemplo os 16% na Tanzânia (Kazwala, 2001) e os 17,1% na Etiópia (Kidane, 2002).

A situação global confirma geralmente a correlação direta que Cosivi e colaboradores (1998) estabeleceram entre a prevalência da tuberculose humana de origem bovina (*M. bovis*) e a prevalência da tuberculose animal. Embora Jalava e colaboradores (2007) constatassem que o aumento do número de casos de

tuberculose bovina no Reino Unido, ocorrido na década de 90, não foi seguida pelo aumento de infecções por *M. bovis* em humanos.

Mas todos estes números, segundo a Organização Mundial de Saúde (1993), pecam por defeito, pelo que têm de ser analisados com especial atenção. Na esmagadora maioria dos casos o agente etiológico isolado dos pacientes com tuberculose é classificado como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* (que inclui todos os agentes etiológicos de tuberculose animal) e muitas vezes o diagnóstico de tuberculose humana baseia-se exclusivamente na colheita de sintomas, radiologia e observação de bacilos álcool-ácido-resistentes em esfregaços (WHO, 1993). Como a sintomatologia provocada por *M. bovis* (e *M. caprae*) é clinicamente e radiologicamente indistinguível da provocada por *M. tuberculosis*, e também os meios de cultura normalmente utilizados (L-J com glicerol) não promovem o crescimento de *M. bovis*, a sua importância pode estar subvalorizada. Além do mais, o isolamento do agente é, por vezes, uma opção muito cara para os países subdesenvolvidos quando comparada com métodos rápidos e baratos, como por exemplo a observação de esfregaços. Nos países onde co-existe tuberculose bovina e humana a distinção entre as duas espécies pode adquirir importância terapêutica, uma vez que, ao contrário de *M. tuberculosis*, *M. bovis* é naturalmente resistente à pirazinamida (PZA), antibiótico de primeira linha utilizado nos casos de tuberculose humana (David *et al*, 2005)

Duarte (2008) refere ainda como fatores para o não reconhecimento de casos de zoonoses por *M. bovis*: (a) a ocorrência de estirpes multirresistentes, tal como ocorre no *M. tuberculosis*; (b) o carácter subclínico da infecção que torna difícil, em termos epidemiológicos, determinar a sua origem; (c) a existência de reservatórios silvestres de *M. bovis*, que pode ser transmitido ao homem em atividades cinegéticas ou manutenção de animais em cativeiro; (d) os planos de erradicação, um pouco por todo o mundo, contemplarem quase exclusivamente a tuberculose bovina, não existindo medidas oficiais para o controlo e monitorização noutras espécies; (e) a comprovação de que não apenas os bovinos e o *M. bovis* estão implicados em casos de zoonose, mas também *M. pinnipedii* e , com crescente relevância desde o seu reconhecimento, *M. caprae*; e finalmente (f) a inexistência de articulação entre entidades de saúde pública humana e veterinária em muitos países, como é o caso de Portugal.

Apesar de uma suposta menor virulência de *M. bovis* para o homem, da maior frequência de lesões não pulmonares que limitam a transmissão entre humanos (Grange, 2001) e de alguns autores negligenciarem no passado esse modo de transmissão, o contágio entre humanos deve ser considerado. Torna-se por isso prudente, sob o ponto de vista da saúde pública, tratar as infecções por *M. bovis* do mesmo modo que as causadas por *M. tuberculosis*, especialmente no âmbito da prevenção (LoBue, 2006).

O homem pode também, em determinados casos, ser a fonte de contágio para os animais. Nestes casos, Lesslie (1960; citado por Garcia e Gutiérrez, 1996) refere que não ocorreriam manifestações clínicas da doença nem disseminação da tuberculose entre os animais, mas, esses animais constituiriam um reservatório da doença para o homem e ficariam sensibilizados face à prova da tuberculina. A crença da ausência de sintomatologia de doença é contrariada por Vera e colaboradores (1989), na descrição de um caso de tuberculose caprina generalizada provocada por *M. tuberculosis*, o que indica claramente a possibilidade de contágio dos caprinos a partir do homem.

## **2.2. Patogenia da Tuberculose Caprina**

Os recentes avanços no campo da genética permitiram a sequenciação de diversos membros do complexo *M. tuberculosis*, o que levou a um maior conhecimento das suas relações filogenéticas, dos seus fatores de virulência e da fisiopatologia da tuberculose (Thoen e Barletta, 2006). Muito do que se sabe sobre a patogenia da tuberculose em caprinos tem por base os modelos investigados nos bovinos, pelo que é incontornável a referência a estes e, obviamente, a *M. bovis*. O modelo de infecção da tuberculose caprina ainda não está descrito, *M. caprae* ainda foi alvo de poucos estudos embora se reconheça a que a progressão da doença e severidade das lesões sejam similares às causadas por *M. bovis* (Bezoz *et al.*, 2011). Porém, os casos de tuberculose descritos em caprinos demonstraram ter algumas características próprias que irão ser abordadas.

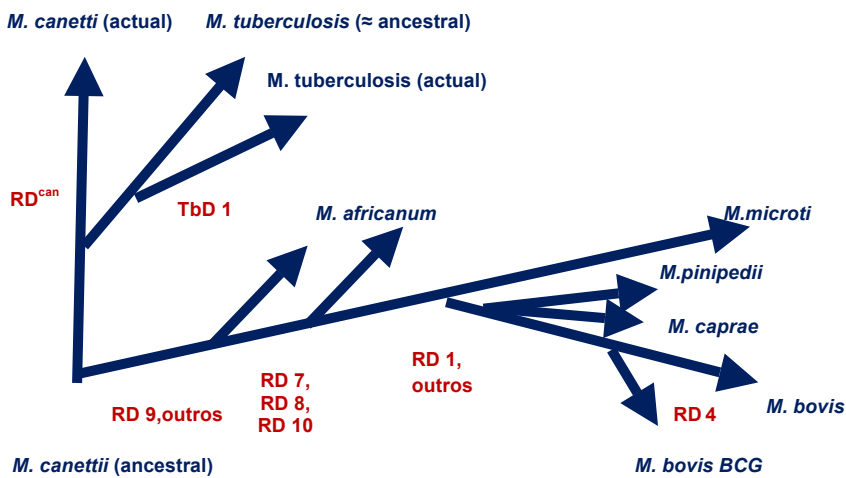
### 2.2.1. Genoma e relações evolutivas de *M. bovis* e *M. caprae*

Um dos aspectos mais importantes do extenso genoma de *M. bovis*, constituído por um elevado conteúdo em guanina + citosina (65,6% GC) e mais de 4 milhões de pares de bases (4,345,492 pb para estirpe AF2122/97 isolada em bovinos), é que se trata de uma versão mais reduzida de *M. tuberculosis* (4,411,532 pb para a estirpe H37Rv isolada em humanos) com mais de 99,95 % de homologia. Para além disso, *M. bovis* não possui genes adicionais relativamente a *M. tuberculosis*. As diferenças que existem entre ambos, nomeadamente ao nível da virulência e espectro de hospedeiros, são devidas a deleções no ADN de *M. bovis*. Assim, pequenas alterações genómicas podem ter um profundo efeito fenotípico, como é disso exemplo: (1) a mutação pontual responsável pela resistência de *M. bovis* à pirazinamida; (2) as variações na sequência dos genes que codificam as proteínas presentes na parede celular (ex. proteínas da família PE-PGRS e PPE com funções de adesão) que podem afetar o tropismo tecidual e o espectro de hospedeiros (3) o locus TbD 1 (presente em *M. bovis* mas ausente na maioria das estirpes de *M. tuberculosis*) que codifica proteínas de transporte e sintetases envolvidas no transporte lipídico e na biossíntese glicolipídica; e (4) as alterações na sequência dos genes que regulam a expressão de outros envolvidos no transporte, estruturas da superfície celular e intermediários do metabolismo. De notar que muitas deleções podem eliminar genes desnecessários à adaptação ao hospedeiro mas levar, mesmo assim, a um diferente, ou mesmo maior, espectro de hospedeiros (Thoen e Barletta, 2006).

Durante muitos anos, *M. bovis* foi considerado como a espécie ancestral de todas as micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Diamond, 2002) e que, por isso, o *M. tuberculosis* seria uma adaptação ao homem de *M. bovis* (Diamond, 2002; Fabre *et al*; 2004). Mas as deleções irreversíveis que foram descritas anteriormente contrariam esse cenário (Thoen e Barletta, 2006). Por isso, Fabre e colaboradores (2004) propuseram recentemente que *Mycobacterium canettii* é a espécie ancestral do complexo *M. tuberculosis*. As várias deleções no ADN, nas denominadas “regiões de diferença” (RD, *regions of difference*), como por exemplo RD 9, deram origem a *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis*.

Tal como a figura 1 indica, outras deleções tiveram lugar, sucessivamente, em outras RD, nomeadamente na RD<sup>can</sup>, RD 7, RD 8, RD 10 e RD 4, dando origem, juntamente com a deleção no locus TbD 1, aos microrganismos do complexo *M.*

*tuberculosis*. A perda da RD 1 ocorreu laboratorialmente durante a atenuação da virulência da estirpe BCG de *M. bovis* (Brosch et al, 2002; Thoen e Barletta, 2006).



**Figura 1-** Evolução proposta para as micobacterias patogênicas a partir da estirpe ancestral do *M. canettii* (Brosch et al, 2002; Thoen e Barletta, 2006).

*M. caprae* demonstra uma combinação especial de polimorfismos nos genes *pncA*, *oxyR*, *katG* and *gyrA*. A análise da sequência do seu gene *gyrB* revela uma particular substituição de nucleotídeos não encontrada em outros membros do complexo *M. tuberculosis*. O facto de *M. bovis* demonstrar maior nº de deleções RD que o *M. caprae* (perda de RD9, RD7, RD8, RD10, RD5, RD6, RD12, RD13 e N-RD25) demonstra que *M. caprae* (ou o seu ancestral) é mais antigo que *M. bovis* (ou seu ancestral) (Aranaz et al., 2003).

## 2.2.2. Patogenia

A tuberculose é uma doença provocada por bacilos parasitas intracelulares obrigatórios, que produzem uma inflamação crónica provocando lesões de tipo granulomatoso (Martín e León, 1998) nos pulmões, intestino, peritoneu, meninges e aparelho reprodutor, entre outros (Domenéch, 2003).

Nos caprinos observam-se, por vezes, lesões iniciais simultaneamente no trato respiratório e digestivo, o que leva a pensar que, apesar da via de transmissão mais frequente ser a aerógena (aerossóis), a via digestiva também pode ser a porta de entrada no organismo de *Mycobacterium bovis*. A zona mais comum de contato de *M.*

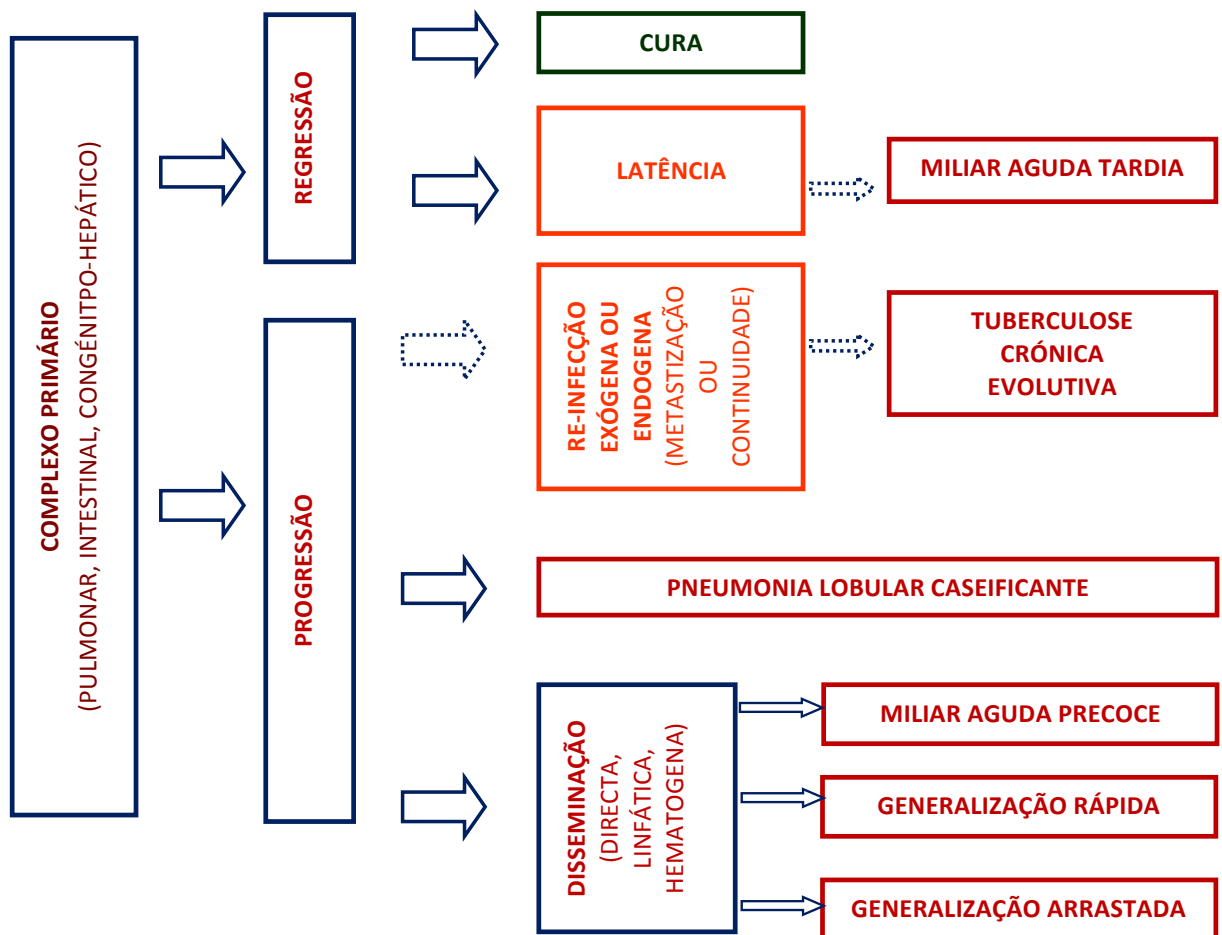
*bovis* com o tecido pulmonar é a zona bronquíolo-alveolar. Na via digestiva, os pulmões serão afetados por via hematogena ou linfática (Garcia, 1996).

Vários estudos revelaram que a natureza e a extensão das lesões varia com a via de exposição e a quantidade de microrganismos no momento da infecção (Thoen e Barletta, 2006), mas Johnson e colaboradores (2007) não encontraram relação entre a dose infectante e a via de exposição e a natureza e extensão das lesões.

Relativamente à infecção aerógena, apenas gotas inaladas com um diâmetro de 2 a 5 µm (com 1 a 3 micobactérias) são capazes de alcançar os espaços alveolares. Partículas de maior tamanho, com um número elevado de bacilos, dificilmente alcançarão o parênquima pulmonar, podendo afetar a faringe ou ser expulsas. Pensa-se que o número mínimo de bacilos necessário para estabelecer uma infecção pulmonar não ultrapasse uma UFC (Dean *et al*, 2006), embora, nas formas digestivas a dose infectante tenha necessariamente de ser muito mais elevada (Neill *et al*, 2001).

Apesar da doença ser conhecida há mais de cem anos, a patogenia da tuberculose causada por *M. bovis* ainda não está completamente esclarecida (Thoen e Barletta, 2006). Após a entrada no organismo, os bacilos vão ser rodeados por neutrófilos e, pouco tempo depois, por macrófagos, ocorrendo então a fagocitose. A capacidade de se multiplicar e sobreviver dentro dos macrófagos do hospedeiro depende da virulência da estirpe de *M. bovis* e é determinada pela composição complexa da sua parede celular (Martín e León, 1998; Quinn *et al*, 2005). A presença de fosfolípidos na membrana celular bacteriana, inibe a fusão do fagossoma com o lisossoma, mas, caso esta ocorra, a produção de enzimas neutraliza os radicais de oxigénio, impedindo desta forma a digestão lisossómica (Rastogi e Sola; 2001; Bartos *et al*; 2004; Quinn *et al*, 2005). Os bacilos que conseguem sobreviver e são libertados pelos macrófagos mortos provocam a atração quimiotáctica de outros monócitos/macrófagos ao foco de infecção, o que leva à formação de granulomas específicos, inicialmente de tamanho microscópico, designado por granuloma tuberculoso (“fóliculo de Koster” *in* Thoen e Himes; 1986) ou, de tamanho macroscópico, menor ou maior, designados por tubérculo ou nódulo tuberculoso, respectivamente (Martín e León, 1998). Estes granulomas são a resposta típica de tipo retardado à infecção micobacteriana (Quinn *et al*, 2005). Consistem numa zona periférica formada por fibroblastos e tecido conjuntivo fibroso, que isolam e circunscrevem a lesão, células mononucleares (linfócitos e macrófagos), células

epitelioides e células gigantes de Langhans (resultantes da fusão de macrófagos), que envolvem uma área central de necrose de caseificação (Jones et al, 1997; Quinn *et al*, 2005). A necrose de caseificação inibe a multiplicação do bacilo, embora ele possa permanecer viável (Léon, 1996), por ser um local com baixo pH e baixa tensão de oxigénio (Cassidy, 2006).



**Figura 2-** Evoluções possíveis da tuberculose a partir do complexo primário (Modificado de Duarte, 2008).

A lesão inicial normalmente localiza-se nas áreas dorsais dos pulmões - “afecção primária” (León, 1986). Mas, independentemente da via de entrada inicial, desenvolver-se-á, em quaisquer circunstâncias, um “complexo primário”, que designa o conjunto da lesão no local de infecção e no gânglio linfático associado.

Este é denominado “complexo primário incompleto” quando apenas se observarem lesões no gânglio linfático (Petisca, 1969 *in* Duarte, 2008) devido à regressão das lesões pulmonares (León, 1996). A migração de macrófagos contendo micobactérias viáveis pode disseminar a infecção para outros órgãos (Quinn *et al*, 2005).

A multiplicação das micobactérias e, conseqüentemente, a evolução do processo (Figura 2), dependem da resistência orgânica, expressa em grande medida pela capacidade de ativação dos macrófagos, e da virulência do bacilo (León, 1996; Martín e León, 1998).

A resposta imunitária do hospedeiro à infecção é um fenómeno complexo. A resposta celular é fundamental no combate à infecção intra-celular pelas micobactérias (Caro *et al*, 2008). A resposta imunitária estabelece-se a partir das 2 a 4 semanas após a infecção (León, 1996), estando envolvidos várias sub-populações: os linfócitos  $\gamma/\delta$  T,  $CD4^+$  e  $CD8^+$  (Pollock *et al*, 2005). Os linfócitos T  $CD4^+$  produzem, entre outras, citocinas importantes como o interferão-gama (INF- $\gamma$ ) e a interleucina2 (IL-2) que vão estimular a activação dos macrófagos e regular a sua atividade bactericida (Cousins *et al*, 2005).

**Tabela 3** - Factores que podem condicionar o desenvolvimento da infecção tuberculosa (León, 1996; Cousins *et al*, 2005)

Factores que podem limitar a infecção:	Factores que predispõem à infecção:
- Características genéticas individuais (não se conhecem diferenças entre raças);	- Sub-nutrição.
- Contacto prévio com o bacilo: (1) vacinação, (2) infecção latente ou eliminada;	- Doenças concorrentes; - Substâncias ou doenças imunossupressoras
- Resistência cruzada a <i>M. avium</i> (Homem)	- Idade (recém-nascidos).

A resposta imunitária é variável individualmente e, se rápida e eficaz, pode limitar o crescimento do bacilo logo na fase inicial da infecção (León, 1996). Assim, em animais imunocompetentes (Tabela 3), pode dar-se a regressão e cura microbiológica, ou evoluir para um estado de latência (Cousins *et al*, 2005). A reativação destas lesões antigas pode ocorrer em caso de colapso da resistência geral (Petisca, 1969 *in* Duarte, 2008).

Em animais com o sistema imunitário comprometido (tabela 3), pode ocorrer uma lenta progressão no órgão afectado (evolução crónica) ou disseminação por via hemolinfática e canalicular a outros órgãos. Em caso de debilidade orgânica acentuada há um conseqüente aumento da sensibilidade, e ocorre generalização, precoce ou tardia, que leva à morte do animal (Martín e León, 1998).

A evolução das lesões de tuberculose é um processo dinâmico que pode alterar o seu curso a qualquer momento, devido tanto a fatores externos como a internos, como sejam a re-infecção e situações imunodepressoras (León, 1996; Duarte, 2008).

Na tuberculose caprina podem encontrar-se lesões de tipo mais exsudativo (i.e. necrose) ou mais produtivo (i.e. granulomas), mas o que mais chama a atenção é a elevada proporção das lesões de carácter exsudativo e a escassa presença de fenómenos de regressão e fibrose. Este facto atesta a elevada sensibilidade desta espécie à tuberculose, bem como a possível virulência das estipes nela implicadas (Bernabé *et al.*, 1991a; León, 1996). Os componentes da resposta imunomediada por células sofrem alterações, consoante o tipo de lesões sejam produtivas ou exsudativas. As lesões exsudativas apresentam uma intensa acumulação de neutrófilos. Esta acumulação sem efeitos óbvios na proliferação de micobactérias sugere que os neutrófilos tem maior importância no desenvolvimento das lesões que na protecção do hospedeiro (Sanchez *et al.*, 2011). Os linfócitos CD4<sup>+</sup> são a população linfocitária T predominante (Seva *et al.*, 2000, Sanchez *et al.*, 2011). Relativamente às lesões produtivas as lesões exsudativas apresentam um significativo decréscimo de na população linfocitária T CD4<sup>+</sup> com aumento de número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e  $\gamma/\delta$  (Sanchez *et al.*, 2011). Um baixo rácio CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> é referido para a tuberculose caprina com lesões exsudativas (Seva *et al.*, 2000, Caro *et al.*, 2008, Sanchez *et al.*, 2011). A enzima iNOS é intensamente expressada pelos macrófagos as lesões exsudativas mas não nas proliferativas (Sanchez *et al.*, 2011). Sanchez e colaboradores (2011) não encontraram diferença no balanço da expressão dos genes de citocinas pró e anti – inflamatórias. Estes achados sugerem que as lesões exsudativas/cavitárias são locais de reactivação onde existem condições ótimas para a proliferação de *Mycobacterium* e que os mecanismos imunológicos envolvidos podem estar na base da intensa destruição pulmonar que caracteriza este tipo de lesão (Sanchez *et al.*, 2011).

A liquefacção do tecido necrótico, frequente na tuberculose caprina, é o fenómeno que mais danos provoca na tuberculose pulmonar, com implicações clínicas

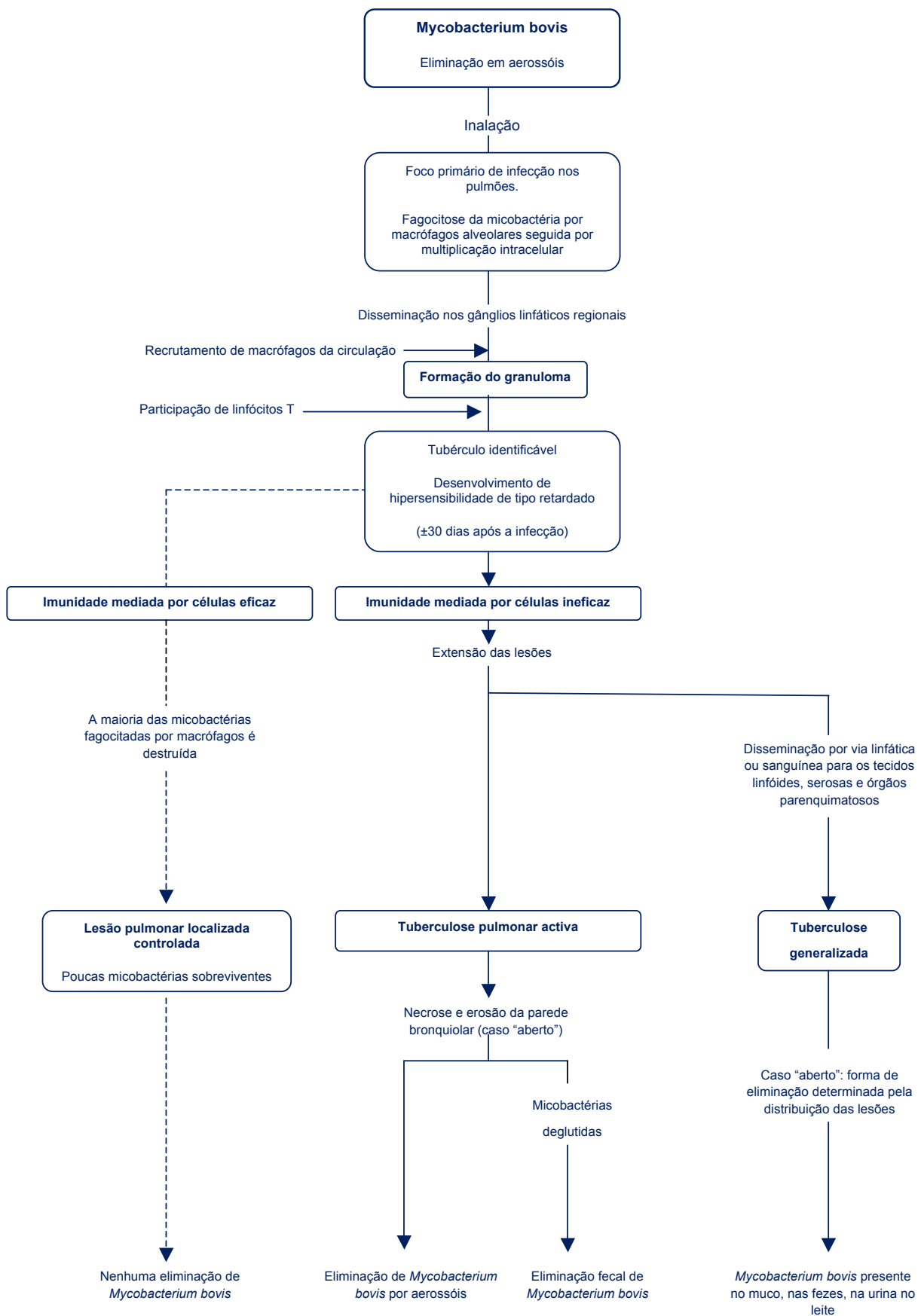
e no contágio da doença. Ocorre devido à libertação de enzimas hidrolíticas pelos neutrófilos e macrófagos mortos. É um fenómeno lento característico das lesões exsudativas, mas que também pode ocorrer, e de forma mais célere, em lesões do tipo produtivo. Esta é a razão pela qual que nem sempre os hospedeiros imunocompetentes controlam a infecção (Léon, 1996).

Uma semelhança entre a tuberculose humana e a caprina é que, devido à formação de cavernas e ruptura das paredes da árvore brônquica, dá-se a disseminação de grandes quantidades de bacilos, provocando pneumonias exsudativas, úlceras traqueais e lesões intestinais por deglutição desse material contaminado (Léon, 1996). Tal como foi descrito pela primeira vez para a lepra humana, a infinidade de combinações lesionais que podem ocorrer nos caprinos, levam a falar num espectro imunopatológico de formas de apresentação da tuberculose caprina (Gutiérrez e Garcia, 1993). Nenhuma destas formas de apresentação da tuberculose (tabela 4) é necessariamente permanente, podendo ocorrer evolução de uma forma para outra.

**Tabela 4-** Espectro imunopatológico das micobactérias (León, 1996).

FORMA	TUBERCULOIDE	TUBERCULOIDE INTERMÉDIA	INTERMÉDIA	LEPROMATOSA INTERMÉDIA	LEPROMATOSA
<i>Frequência</i>	Pequena		Maioritária		Pequena
<i>Imunidade celular</i>	+++++	+++	++	+	-
<i>Imunidade humoral</i>	-	+	++	+++	++++
<i>Reacção à tuberculina</i>	++++	+++	++	+	- (anergia)
<i>Resposta serológica</i>	-	+	++	+++	++++
<i>Presença de micobactérias</i>	+/-	+	+	+++	++++
<i>Aspecto histológico</i>	Pequenos granulomas: sem danos		Reacção lesional intensa		Excesso de antígeno; necrose.
<i>Eliminação de micobactérias</i>	Não		Possível		Sim

Os caprinos mais afectados, com lesões extensas, encontram-se sempre nas zonas intermédias. Sendo que as tuberculoides – intermédias possuem um carácter exsudativo e as lepromatosas-intermédias um carácter proliferativo (Gutiérrez e Garcia, 1993; Léon, 1996). A figura 3 resume a patogenia da doença.



**Figura 3-** Patogenia do *Mycobacterium bovis* (Adaptado de Quinn *et al*, 2005)

O período de incubação da doença é muito variável, podendo ir de meses a anos, o que significa que um animal pode estar infectado durante muito tempo sem que apresente alterações clínicas significativas. O período clínico, tal como se discutirá mais à frente, tende, à excepção dos casos de generalização precoce, a ser crónico, embora mais curto que o período de incubação.

### 2.3. Epidemiologia da Tuberculose em caprinos

Existem casos de tuberculose em caprinos descritos em todo o mundo (Gomez *et al.*, 1998), ainda que de uma forma irregular no que diz respeito à gravidade clínica e à prevalência do processo (Cataldi e Romano, 2007). Por vezes são simples descrições de casos esporádicos mas, noutras ocasiões, referem-se a países, como a Espanha, onde a doença tem um carácter endémico em algumas regiões autónomas, e está descrita desde 1911. Nestes casos a tuberculose pode ser uma das doenças caprinas de maior impacto, pela elevada mortalidade e perdas económicas que causa (Garcia e Gutiérrez, 1996) sobretudo pelo seu impacto negativo na produção de leite e de carne (Cvetic *et al.*, 2007, LoBue, *et al.*, 2010).

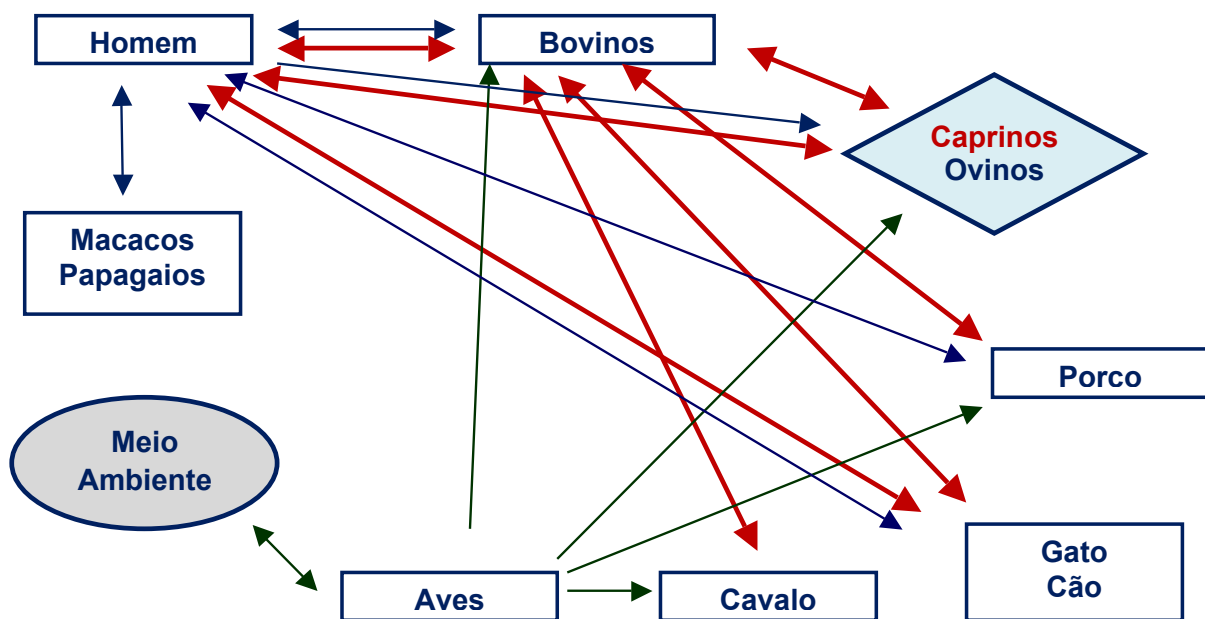


Figura 4 – Transmissão do *M. bovis*, *M. tuberculosis* e *M. avium* em ambiente doméstico (Modificado de Vicente, 2004).

Como anteriormente referido, os principais agentes que podem provocar tuberculose em caprinos são *M. bovis* e *M. caprae*, mas também foram descritos casos em que outros bacilos, como *M. tuberculosis*, *M. avium* e, até *M. kansasii*, causaram a doença.

A capacidade que os microrganismos do género *Mycobacterium* têm para infectar um ou mais hospedeiros heterólogos, ou seja, hospedeiros que à partida não se esperaria serem infectados, faz da tuberculose, em qualquer espécie animal, uma ameaça potencial para as outras espécies, incluindo o homem (Figura 4). Esta transmissibilidade das infecções a outras espécies diferentes do hospedeiro “natural” constitui um dos maiores problemas no controlo desta doença (Konyha *et al*, 1980 in Vicente 2004).

Entre os animais domésticos os hospedeiros naturais de *M. bovis* são os bovinos (Cousins *et al*, 1993), actuando os caprinos como hospedeiro secundário ou até mesmo primário nas zonas semi-áridas (Martin e León, 1998; Pignata *et al*, 2009). Estas espécies são por isso as mais propensas ao desenvolvimento da tuberculose por *M. bovis* (Martin e León, 1998). Outros mamíferos podem ter uma sensibilidade intermédia, como os cães, os gatos e os suínos (Domenéch, 2003). Os gatos, são tidos como perpetuadores da doença nos bovinos (Carter, 1988) e, contrariamente aos cães, foram descritos como fonte de tuberculose humana (Monies *et al*, 2000). Nas ovelhas e nos cavalos a doença ocorre raramente (Cataldi e Romano, 2007) o que sugere alguma resistência natural à doença (Radostits *et al*, 2007).

Entre os animais silváticos, na Península Ibérica, *M. bovis* foi isolado principalmente em veados (*Cervus elaphus*) e javalis (*Sus scrofa*) (Tato *et al*, 1997) mas também em gamos (*Dama dama*), lebres (*Lepus europaeus*) (Aranáz *et al*, 2004), raposas (*Vulpes vulpes*) (Martín-Atance *et al*, 2005) e mesmo no lince-ibérico (*Lynx pardinus*) (Briones *et al*, 2000). Os veados e os alces destacam-se por, na natureza ou em cativeiro, possuírem uma grande capacidade de transmitir a doença ao homem (Delahay *et al*, 2001).

Nos javalis estão descritos mais casos de tuberculose do que no porco doméstico (Cataldi e Romano, 2007). São considerados por alguns autores, tal como o porco, um “fundo de saco epidemiológico” (Serraino *et al*, 1999), mas estudos mais recentes sugerem que são um reservatório de *M. bovis* (Aranaz *et al*, 2004) e podem ser um agente de disseminação da tuberculose (Parra *et al*, 2006).

Em Portugal, à semelhança do que aconteceu noutros países, Duarte e colaboradores (2007) referem a partilha de estirpes de *M. bovis* entre espécies silvestres (javalis) e domésticas (bovinos).

No Reino Unido, o texugo (*Meles meles*) (Hutchins e Harris; 1997; Vicente *et al*, 2007), e na Nova Zelândia, o opossum (*Trichosurus vulpecula*) (Morris *et al*, 1994), são também importantes reservatórios naturais de *M.bovis*, que, além do mais, interferem com as campanhas de erradicação da tuberculose em bovinos (Garcia e Gutiérrez, 1996; Radostits *et al*, 2007). Embora na Península Ibérica ainda não fosse demonstrada a existência de lesões de tuberculose nem de micobactérias em texugos (Martín-Atance *et al*, 2005), já foram detectados anticorpos contra a proteína MPB70 do *M. bovis* em vários animais desta espécie (Martín-Atance *et al*, 2006).

*M. bovis* também já foi isolado em amostras colhidas em várias outras espécies animais, como por exemplo o búfalo, o coelho, o antílope, o elefante, o camelo, o furão, o rato e o visão (González *et al*, 1998). Esta bactéria afecta ainda caprinos selvagens, como espécies da cabra montês ou bezoar: *Capra aegagru* (Pavlik *et al*, 2002) e *Capra pyrenaica* (Fandos, 1991 in Pérez *et al*, 2002). Rhodes e colaboradores (2007), inclusivé, referem alguns protozoários como seus reservatórios ambientais.

Por seu lado, *M. caprae* já foi isolado em bovinos (Pavlik *et al.*, 2002, Prodinge *et al.*, 2002, Erler *et al.*, 2004, Duarte *et al.*, 2008, Boniotti *et al.*, 2009), suínos (Pavlik *et al.*, 2002), veados (*Cervus elaphus*) (Pavlik *et al.*, 2002, Prodinge *et al.*, 2002) e javalis (*Sus scrofa*) (Erler *et al.*, 2004). O seu isolamento em humanos também já foi descrito (Kubica *et al.*, 2003, Erler *et al.*, 2004) sendo o contacto com animais (Prodinge *et al.*, 2002) e as actividades veterinárias (Aranaz *et al.*, 1999) sugeridos como fontes mais prováveis de infecção. Este agente tem sido isolado maioritariamente na Europa mas já foi isolado em um paciente na Austrália (Sintchenko *et al.*, 2006) e num bovino na Argélia (Sahraoui, *et al.*, 2009). Em Espanha, num estudo retrospectivo com amostras colhidas entre 1992 e 2009, Rodriguez e colaboradores (2011) identificaram *M. caprae* em caprinos, ovinos (*Ovis aries*), bovinos, suínos, javalís, veados e numa raposa (*Vulpes vulpes*). Os caprinos com tuberculose causada por *M. caprae* constituem assim um grave problema pela possível transmissão a humanos (Gutierrez *et al.*, 1997, Kubica *et al.*, 2003), bovinos e outros animais domésticos (Vordermeier *et al.*, 2002, Ctenic *et al.*, 2007, Rodriguez *et al.*, 2011) e à fauna silvestre (Prodinge *et al.*, 2002, Rodriguez *et al.*, 2011) principalmente em regiões/países onde a infecção está generalizada e o centro epidemiológico desta são os caprinos (Rodriguez *et al.*, 2011).

Alguns autores observaram mais infecções em bovinos por *M. caprae* em regiões com elevada densidade de caprinos. Apesar de na maioria das explorações (86,7%) não ocorrer contacto com caprinos (Rodriguez *et al.*, 2011) e de em países

virtualmente indemnes de tuberculose como a Alemanha, Áustria e República Checa grande nº de casos em bovinos e veados ser causado por *M. caprae* (Pavlik *et al.*, 2002, Proding *et al.*, 2002, Kubica *et al.*, 2003).

O contágio entre bovinos e caprinos, perdeu muita da importância que lhe era atribuída, ao constatar-se que, mediante análises genómicas, as estirpes isoladas em bovinos são diferentes das isoladas nos caprinos, inclusivamente em rebanhos muito próximos. Isto pode significar que existem estirpes que se adaptaram aos caprinos e se transmitem preferencialmente intra-espécie, ao invés de inter-espécies (Garcia e Gutiérrez, 1996). No entanto, nos caprinos domésticos em contacto com explorações bovinas infectadas a prevalência pode atingir os 70 % (Radostits *et al.*, 2007). Além disso, a confirmação da transmissão de *M. bovis* (Zanardi *et al.*, 2013) e de *M. caprae* (Napp *et al.*, 2013) em explorações com bovinos e caprinos em contacto directo evidência o papel que estas espécies podem ter na epidemiologia da tuberculose.

Por outro lado, em caprinos domésticos, selvagens e de jardim zoológico já se diagnosticou *M. tuberculosis* (Vera *et al.*, 1989; Bernabé *et al.*, 1991a; Oh *et al.*, 2002; Tato, 1999 citado por Vicente, 2004; Cadmus *et al.*, 2009, Kassa *et al.*, 2012; Deresa *et al.*, 2013).

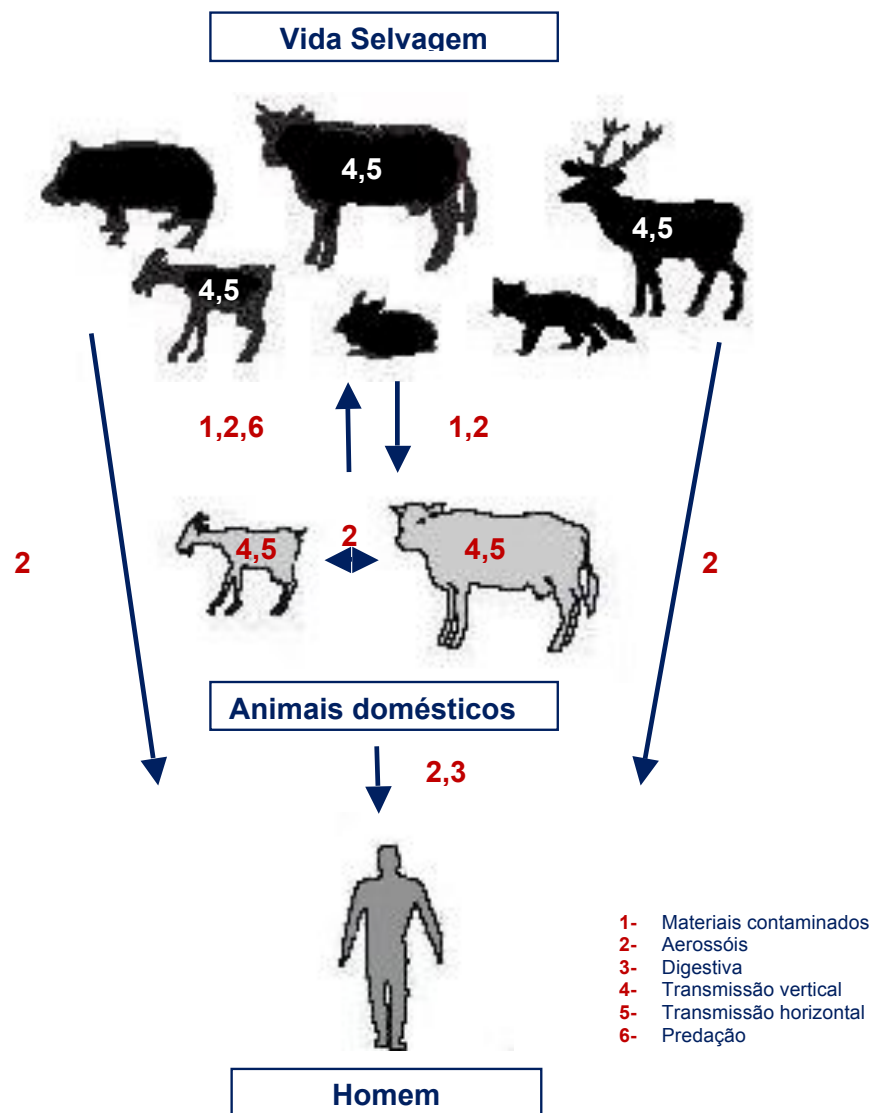
Assim, os caprinos podem ser uma fonte de infecção para o homem, embora em menor grau que os bovinos. E podem, juntamente com os ovinos e suínos, ser infectados por estirpes presentes nos bovinos (*M. bovis*, *M. caprae*), nas aves (*M. avium*) e no homem (*M. tuberculosis* e *M. bovis*) (Acha e Szyfres, 2003).

*M. avium* (*spp. avium*), responsável por quadros de tuberculose em aves e suínos, parece não desempenhar um papel importante nos caprinos, já que apenas foi responsabilizado por um insignificante número de casos de tuberculose (Bernabé *et al.*, 1991a). Além do mais, este agente possui, tanto quanto se sabe hoje em dia, pouca importância zoonótica (Vicente, 2004).

### **2.3.2. Vias de infecção e transmissão**

As vias de transmissão dos agentes da tuberculose podem ser deduzidas pela localização anatómica das lesões, em particular do complexo primário. Animais com lesões na cavidade torácica indicam infecção pela inalação de aerossóis (Pollock *et al.*, 2002), nas lesões dos gânglios linfáticos mesentéricos ou retrofaringeos a infecção terá ocorrido por ingestão (Garcia e Gutiérrez, 1996) e as lesões hepáticas indicam infecção congénita (Duarte, 2008).

De igual modo, a excreção de micobactérias por animais infectados ocorre por diferentes vias, dependendo da localização das lesões. A via aérea, pela presença de lesões pulmonares, é o principal mecanismo de excreção do bacilo (Martín e León, 1998) e a principal forma de transmissão nos países desenvolvidos (Cousins *et al.*, 2005). A presença de lesões intestinais ou hepáticas e, mesmo lesões pulmonares com a deglutição de muco, levam à excreção de bacilos para o meio através das fezes e a consequente contaminação das pastagens, propiciando o contágio por ingestão (Martín e León, 1998; Cousins *et al.*, 2005). A via digestiva também pode ocorrer associada à transmissão lactogénica às crias e ao homem.



**Figura 5-** Possíveis vias de transmissão do *M. bovis* entre os animais domésticos, silváticos e o homem (Modificado de Biet *et al.*, 2005).

A excreção do agente também pode ocorrer por via urinária (em lesões renais), congénita (Martín e León, 1998), venérea, cutânea e pelas mucosas (Garcia e Gutiérrez, 1996; Neill *et al.*, 2001). A excreção do bacilo não é constante, pode ocorrer antes do aparecimento dos sintomas e tornar-se intermitente ao longo da evolução da infecção (Cousins *et al.*, 2005).

A transmissão para os caprinos pode ocorrer por via aérea através do pastoreio em conjunto com bovinos infectados (Cousins *et al.*, 1993). Já nos rebanhos, o contágio por esta via é facilitado pela produção intensiva ou permanência em local fechado de um grande número de animais (Garcia e Gutiérrez, 1996), já que o agente sobrevive com relativa facilidade nos aerossóis (Gannon *et al.*, 2007).

Um facto interessante na tuberculose caprina é a observação de lesões iniciais nos pulmões e placas de Peyer ileo-cecais, o que sugere contágio aerógeno e digestivo simultâneo. A falta de dados sobre a doença em animais recém-nascidos faz com que a infecção congénita ainda não tenha sido descrita. Existem também poucos estudos sobre a presença de bacilos no leite, mas supõe-se que este produto possa ser uma fonte de infecção. Nos estudos até agora efectuados, a percentagem de lesões mamárias observadas é muito baixa (Garcia e Gutiérrez, 1996) à semelhança do que, aliás, acontece actualmente nos bovinos (Cousins *et al.*, 2005).

O contágio indireto pode ocorrer graças à capacidade de resistência das micobactérias, nomeadamente *M. bovis* a condições ambientais adversas (Tabela 5).

**Tabela 5 – Resistência do *Mycobacterium bovis***  
(Garcia e Gutiérrez, 1996; Martín e León, 1998; Biberstein e Hirsh, 1999; Quinn *et al.*, 2005).

<b>RESISTENCIA DO <i>M. BOVIS</i></b>
- Sobrevive até 3 dias de radiação solar direta;
- Enterrados um a cinco centímetros no solo sobrevivem entre 1 a 2 anos;
- Resistentes à acção de ácidos, alcoois e detergentes catiónicos;
- Sobrevivem à exposição a uma solução molar de NaOH ou HCl durante 30 minutos (característica usada na descontaminação de amostras para diagnóstico);
- Resistente à secagem pode sobreviver até 4 semanas no solo protegido da luz solar, 74 dias em fómites e 49 dias em pastos húmidos;
- Sobrevive melhor sobre condições de frio,
- No estrume, protegido da luz e a temperaturas entre 12 e 24 °C, pode sobreviver entre 6 meses a um ano;
- No estrume, expostos à radiação solar, permanecem viáveis durante 18 a 31 dias;
- Na água corrente, entre 18 a 24 °C, mantêm-se durante mais de 200 dias, e até quase 2 anos se esta tiver materiais fecais ou urina;
- Bacilos podem resistir em iogurte e creme de queijo feitos a partir de leite não pasteurizado por mais de 14 dias; e na manteiga por mais de 100 dias.

O tempo de sobrevivência do bacilo no meio ambiente está condicionado pela exposição solar direta, a humidade e a presença de matéria orgânica. O bacilo consegue sobreviver muito tempo nos cadáveres com lesões de necrose por caseificação. Apenas é inativado por alguns desinfetantes se não tiver protegido por matéria orgânica ou terra, tais como a formalina entre 3 e 8%, o fenol a 5%, os iodóforos e fenois a 2 % seguidos de vapores de formaldeído. Temperaturas superiores a 60°C durante 5 a 20 minutos também conseguem a sua inativação (Garcia e Gutiérrez, 1996).

Como factores que favorecem o contágio temos, para além da grande resistência no meio ambiente, a aglomeração de animais; a co-habitação entre animais adultos e jovens (mais sensíveis à doença pela sua escassa imunocompetência), e factores imunossupressores (sub-nutrição, doenças, más condições higiénicas; práticas incorrectas de maneio) (Griffin *et al.*, 1993; Martín e León, 1998; Menzies e Neill, 2000). A existência de um grande número de caprinos com lesões exsudativas que excretam muitos bacilos num curto periodo de tempo, conduzem também a uma rápida difusão da doença (Garcia e Gutiérrez, 1996).

Sob o ponto de vista epidemiológico, o aparecimento e difusão da tuberculose animal podem ser fomentados pela deslocação de animais selvagens para novos locais. Como é o caso de veados, javalis, aves selvagens e até cães de caça podem servir de elemento de ligação entre ecossistemas diferentes (León, 1991; Eisenach, 1994).

Quanto à transmissão de *M.bovis/M. caprae* a partir dos animais para o homem, consideram-se tradicionalmente três vias de transmissão: ingestão de productos lácteos contaminados, inalação de aérossóis e inoculação directa na pele (LoBue, 2006). Os aerossóis podem resultar da excreção de animais infectados mas também da manipulação de carcaças com lesões (Neill *et al.*, 1991). A transmissão entre humanos por este agente é pouco comum e acontece sobretudo em pessoas imunodeprimidas (Grange e Yates, 1994).

### **2.3.1. Situação da tuberculose em caprinos na Europa e no Mundo**

Com a modernização da produção caprina a abordagem sanitária a esta espécie intensificou-se, e a tuberculose neste contexto passou de uma doença raramente diagnosticada, a uma das doenças crónicas mais importantes nos caprinos (Garcia *et al.*, 1996; Acosta *et al.*, 2000). De facto, apesar de não existirem dados

oficiais da incidência ou prevalência, mesmo nos países mais industrializados, são vários os relatos da doença. Uma revisão exhaustiva dos casos de tuberculose em caprinos parece indicar que esta não apresenta igual prevalência e gravidade em todo o mundo. Vários investigadores e inspectores sanitários de matadouros referem encontrar com frequência estas lesões em Espanha e França (Thorel, 1984; Bernabé *et al.*, 1991; Garcia & Gutierrez, 1996; Benet, 2006; EFSA 2009, Bezos *et al.*, 2010). Em algumas comunidades autónomas de Espanha (i.e. Murcia) encontraram-se vários efectivos com mais de um terço dos animais atingidos por vezes com todos os animais a reagirem positivamente à tuberculina (Garcia & Gutierrez), nas Ilhas Canárias 8% de animais testados por Acosta e colaboradores (2000b) a reagirem positivamente ao ELISA e nas Astúrias 92% das explorações testadas (em 25) e 12% dos animais (em 600) a terem resultados positivos ao teste do INF- $\gamma$  (Balseiro *et al.*, 2001)

Noutros países, a tuberculose caprina está descrita, sobretudo, em casos pontuais, como são disso exemplo a Itália (Tratadi *et al.*, 1976; Paterlini, 2007, Zanardi *et al.*, 2013), Reino-Unido (Palittapongarnpim *et al.*, 1993; Crawshaw *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2009, EFSA, 2009), Irlanda (Sharpe *et al.*, 2010, Shanahan *et al.*, 2011), Alemanha (Deckwer, 1950; Ruppert, 1992), Bulgária (Savov, 1974), Grécia (Ikonomopoulos *et al.*, 2006), Rússia (Kel'dybaev e Turkaeva, 1969), Estados Unidos da América (Golden, 1921), Antígua e Barbuda (Hutson, 1941), Peru (Manrique, 2004), Brasil (Benesi *et al.*, 2008; Pitagna *et al.*, 2009), Tanzânia (Milne, 1955), Uganda (Carmichael, 1941), Zâmbia (Sharma, 1985), Nigéria (Alaku e Moruppa, 1993, Cadmus *et al.*, 2009), Etiópia (Shitaye *et al.*, 2006, Hiko e Agga, 2011) África do Sul (Huchezermyer *et al.*, 1994), Índia (Iyer, 1932; Mohan, 1950; Sharan *et al.*, 1988), Japão (Une e Mori, 2007), Austrália (Cousins *et al.*, 1993) e a Nova Zelândia (Sanson, 1988).

Em Portugal, Duarte e colaboradores (2008) referem, num estudo realizado entre 2002 e 2007, o isolamento de bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* efectuado em oito caprinos. Em sete desses casos isolou-se *Mycobacterium bovis* e em um caso *Mycobacterium caprae* (Duarte, 2008). Quintas e colaboradores (2010) descreveram um surto de tuberculose num rebanho de caprinos.

## **2.4. Diagnóstico da Tuberculose dos caprinos**

### **2.4.1. Diagnóstico *ante-mortem***

A abordagem clínica convencional, por si só, não é suficiente para realizar um diagnóstico de tuberculose nos caprinos. Na abordagem ao efectivo devem ser recolhidos todos os dados relevantes, tanto a nível individual como colectivo, uma vez que várias doenças crónicas podem ter um quadro clínico idêntico. Especial atenção deve ser dada a efectivos onde o número de animais atingidos é baixo e a ocorrência da doença é esporádica, e como tal de mais difícil diagnóstico (Garcia e Gutiérrez, 1996b). A hipótese de tuberculose nem sempre é colocada após o exame clínico, pois, muitas vezes, a tuberculose cursa sem que manifestação de um quadro sintomatológico evidente ocorra (Martin e León, 1998).

De qualquer modo, o diagnóstico clínico deve sempre ser confirmado através de provas complementares. Para tal, existem várias provas que podem ser utilizadas e se podem dividir em dois grupos: as baseadas na resposta imunitária celular e as baseadas na resposta imunitária humoral (Garcia e Gutiérrez, 1996b).

#### **2.4.1.1. Diagnóstico clínico**

Esta doença foi durante muito tempo ignorada ou confundida com outros processos respiratórios como bronquites parasitárias ou broncopneumonias de origem microbiana, o que fez permanecer a falsa ideia de que a cabra era particularmente resistente ao bacilo da tuberculose (Bernabé *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 2008).

A tuberculose, provocada por *M. bovis* ou *M. caprae*, pode causar quadros respiratórios severos nos caprinos ou permanecer num estado sub-clínico (Smith e Sherman, 2009). No entanto, a sua evolução clínica é preponderantemente crónica (Perea *et al.*, 1999) com período de incubação a variar entre algumas semanas a poucos meses (Garcia e Gutiérrez, 1996). Assim, a tuberculose nesta espécie apresenta uma evolução clínica relativamente rápida, caracterizada por uma fase de generalização com disseminação linfohematogena e com a eliminação, nas suas formas abertas, de grande quantidade de bacilos para o meio ambiente, através da tosse, expectoração e das fezes (Perea *et al.*, 1999).

Os sintomas são inespecíficos e dependem dos órgãos afectados. Alguns caprinos, mesmo com lesões extensas, podem não apresentar sintomas (Matthews, 2009). A doença torna-se clinicamente evidente em rebanhos com 25-30 % dos animais atingidos, em que estes apresentam emagrecimento crónico e progressivo, com ou sem diarreia, que culmina com a morte (Garcia e Gutiérrez, 1996; Matthews, 2009). Outros sintomas comuns são anemia, pêlo eriçado ou queda de pêlo e diminuição da produção de leite (Bernabé et al., 1991; Garcia e Gutiérrez, 1996; Perea et al., 1999). Algumas cabras podem mesmo apresentar lesões nodulares sólidas na glândula mamária (Smith e Sherman, 2009). Nos efectivos atingidos a mortalidade é variável (Perea et al., 1999), podendo em alguns casos chegar aos 20-30% anuais, existindo animais afectados de todas as idades, embora seja mais frequente nos jovens adultos (Garcia e Gutiérrez, 1996).

As alterações respiratórias são inconstantes e surgem principalmente nas fases finais da doença (Garcia e Gutiérrez, 1996; Perea et al., 1999). Têm início com tosse crónica profunda e produtiva, surgindo posteriormente taquipneia, dispneia e ruídos pulmonares anormais (Belknap, 2005). Os gânglios linfáticos superficiais podem estar aumentados e ser facilmente palpáveis (Matthews, 2009). O aumento dos gânglios linfáticos regionais pode contribuir para o aparecimento de estridor, disfagia e timpanismo (Belknap, 2005).

Em casos raros podem surgir fístulas, úlceras e nódulos na pele (Matthews, 2009).

#### **2.4.1.2. Intradermotuberculinização (IDT)**

A descoberta acidental da tuberculina por Robert Koch em 1890 durante a tentativa de desenvolvimento de uma vacina para a tuberculose foi, sem dúvida alguma, o contributo mais importante na história do diagnóstico da tuberculose nos animais domésticos (Garcia e Gutiérrez, 1996b). Tanto que a intradermotuberculinização, prova da tuberculina ou ainda denominada prova de Mantoux em medicina humana, é, ainda hoje, a principal prova de diagnóstico da tuberculose em todo o mundo.

É utilizada oficialmente desde 1910 como base dos programas de erradicação da tuberculose bovina, primeiro na Finlândia depois progressivamente em outros países. Em 1937, a tuberculina de Koch ("old protein"), que se obtinha das proteínas existentes num meio líquido onde cresceu *M. tuberculosis*, foi substituída pela

tuberculina constituída por um derivado proteico hidrossolúvel purificado (PPD – Proteín Purified Derivate), obtido a partir do crescimento de *M. tuberculosis*, num meio sintético não proteico de modo a aumentar a sensibilidade da prova. A partir de 1975, a PPD utilizada em veterinária é obtida em culturas de *M. bovis* (Huchzermeyer et al. 1994; Garcia e Gutiérrez, 1996b). A tuberculina mamífera que actualmente se utiliza é a fracção hidrossolúvel de produtos tratados pelo calor, obtidos do crescimento e lise do *M. bovis* (OIE, 2004), constituída por péptidos de diferentes tamanhos e com propriedades antigénicas (Duarte, 2008).

A IDT baseia-se numa resposta imunitária específica de tipo celular mediada por linfócitos T (Tizard, 2009). Quando a tuberculina é inoculada na derme de um animal não sensibilizado aos antígenos da tuberculina, não ocorre nenhuma resposta inflamatória significativa. Por outro lado, se for inoculada num animal sensibilizado, como consequência da infecção por *M. bovis*/*M. caprae*, desencadeia-se uma reacção de hipersensibilidade retardada do tipo IV. Após a aplicação intradérmica de tuberculina ocorre o desenvolvimento inicial lento de uma tumefacção avermelhada e endurecida no local de injeção. Essa inflamação inicia-se entre as 12 e 24 horas e alcança a maior intensidade por volta das 48-72 horas e pode persistir por várias semanas antes de desaparecer gradualmente (Pollock *et al.*, 2003; Tizard, 2009). Em reacções muito severas pode ocorrer necrose e destruição tecidual no local de administração (Tizard, 2009).

Existem dois tipos principais de provas de IDT: a simples e a comparada. Na IDT simples administra-se, tanto em bovinos como em caprinos, uma única injeção de 0,1ml de tuberculina mamífera, na zona cervical, na prega anal ou caudal ou na espádua (OIE, 2004). Pode ainda fazer-se uma aplicação adicional na junção mucocutânea dos lábios vulvares. Considera-se que o teste cervical possui maior sensibilidade e o da prega caudal maior especificidade (Radostitis *et al.*, 2007)

A IDT comparada, prova oficial de rastreio da tuberculose bovina em Portugal, pode ser usada em caprinos, com a administração simultânea, de uma injeção de tuberculina mamífera (preparada a partir da estirpe de *M. bovis* AN5) e uma injeção de tuberculina aviária (preparada a partir da estirpe de *M. avium* D4ER) em lados diferentes do pescoço (Garcia e Gutiérrez, 1996b; OIE, 2004). Também se podem inocular no mesmo lado na zona da espádua desde que separadas por 10 cm (Garcia e Gutiérrez, 1996b). Esta prova permite uma melhor discriminação entre os animais infectados por *M. bovis* daqueles sensibilizados por bacilos do complexo *M. avium* ou outras bactérias não patogénicas presentes no meio (Monagan *et al.*, 1994), uma vez que os animais infectados por uma micobactéria diferente do *M. bovis*/*M. caprae*

reagem com maior intensidade à tuberculina aviária do que à mamífera (Koler *et al.*, 2001; Hope *et al.*, 2005).

A leitura da prova realiza-se 72 horas depois da inoculação e a avaliação é feita com base no aumento da espessura da pele no local de inoculação, devendo também realizar-se uma palpação para verificar se existem sinais de inflamação (OIE, 2004).

Na IDT simples considera-se que uma reação é positiva quando ocorre um aumento da espessura da pele ou existem sinais clínicos como edema, exudação, necrose, dor e inflamação no local de inoculação. Na IDT comparada considera-se como positiva se a reação à tuberculina mamífera é maior que à aviária ou se existem sinais clínicos. A discriminação entre animais positivos, duvidosos e negativos a ambas as provas pode obter-se seguindo os critérios da legislação nacional e comunitária (Directiva 97/12/CEE transposta para a legislação nacional pelo Decreto-Lei n.º 157/98 de 9 de Junho alterado pelo Decreto-Lei n.º 378/99 de 21 de Setembro e Decreto-Lei n.º 272/2000 de 8 de Novembro; e Regulamento (CE) n.º 126/2002 da Comissão de 8 de Julho).

Existem outras variantes de IDT que se podem realizar, embora ainda não descritas em caprinos. Uma é a prova subcutânea ou térmica rápida. Consiste em inocular a tuberculina por via subcutânea e observar, nas horas seguintes, um aumento da temperatura do animal. Exige a medição da temperatura sob um protocolo rigoroso de difícil aplicação em condições de campo. Outras são a oftalmorreacção e a prova de Stormont, semelhante à IDT simples mas com uma injeção adicional sete dias depois, o que tem como inconveniente a necessidade de realizar pelo menos três visitas à exploração (Radostitis *et al.*, 2007; Serrano e Uceda, 2007).

#### **2.4.1.3. Prova do Interferão $\gamma$**

A prova do IFN-  $\gamma$  foi desenvolvida na Austrália nos finais dos anos 80 como prova de diagnóstico alternativa à IDT (Cousins, 2001) e, tal como esta, baseia-se na resposta imunitária de tipo celular (Welsh *et al.*, 2005). Provou ao longo dos anos ser uma mais valia no diagnóstico da tuberculose, de tal modo que é uma prova complementar à IDT, prevista nos planos de erradicação da tuberculose bovina dos países da União Europeia desde Julho de 2002 (OIE, 2004).

O IFN-  $\gamma$  é uma citocina libertada principalmente por linfócitos T como resposta à exposição a um determinado antigénio e constituiu o maior factor activador

de macrófagos na tuberculose (Sánchez *et al.*; 2008). A prova do IFN- $\gamma$  baseia-se na quantificação da libertação desta citocina por linfócitos T previamente sensibilizados com tuberculina (PPD mamífera) ou um antigénio similar ao *M. bovis* (Wood *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*; 2008).

É uma prova *in vitro* realizada a partir de amostras de sangue heparinizado de animais suspeitos, que têm de ser enviadas para o laboratório de imediato, uma vez que tem de ser iniciada até 8 horas após a colheita. A prova divide-se em duas etapas; na primeira, são recolhidas pequenas amostras em duplicado que são incubadas a 37 °C com os antigénios PPD mamífero e PPD aviário, e ainda com um antigénio de controlo negativo. Depois de 16 a 24 horas de incubação recolhem-se os sobrenadantes. Na segunda etapa, é utilizado um kit comercial, desenvolvido para os bovinos (Bovigam® Prionics, Suíça), para avaliar a quantidade de IFN- $\gamma$  mediante uma técnica de ELISA de captura e os resultados obtidos são expressos em unidades de densidade óptica (OD) (Wood e Rothel, 1994; Ryan *et al.*, 2000; Buddle *et al.*, 2001; Wood e Jones, 2001; Duarte, 2008).

Se um animal foi infectado por *M. avium* ou outra micobactéria ambiental, a produção de IFN- $\gamma$  será maior quando se incuba com a PPD aviária. Por outro lado, um animal é considerado positivo à tuberculose quando a produção de IFN- $\gamma$  é maior nas amostras incubadas com PPD mamífera do que nas incubadas com a PPD aviária ou com o controlo negativo (Sánchez *et al.*; 2008).

#### **2.4.1.4. ELISA: “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”**

Complementarmente às provas baseadas na imunidade celular (i.e. IDT e IFN- $\gamma$ ), podem também ser utilizadas no âmbito do controlo da tuberculose animal, provas baseadas na resposta imunitária humoral, ou seja, na detecção de anticorpos séricos específicos (Garcia e Gutiérrez, 1996b). Este tipo de resposta imunitária aparece apenas em estados mais avançados da doença, uma vez que, a presença de anticorpos séricos nas infecções por micobactérias patogénicas é directamente proporcional ao número de bacilos presentes. Por outro lado existe uma relação indirecta entre a resposta humoral e a de tipo celular (O’ Reilly e Daborn; Garcia e Gutiérrez, 1996b), com uma proponderância clara da imunidade de tipo celular, o que constitui a maior limitação ao desenvolvimento deste tipo de provas (Neill *et al.*, 2001; Pollock e Neil, 2002; Welsh *et al.*, 2005).

Para além das limitações em termos de sensibilidade e especificidade da IDT e das dificuldades de adaptação da técnica aos caprinos, nomeadamente os mais jovens com pele fina (Shanahan *et al.*, 2011), em animais com curso crónico da doença pode ocorrer anergia por esgotamento imunitário e levar ao aparecimento de falsos negativos à IDT. Estes casos poderão ser detectados apenas por técnicas baseadas na resposta humoral e são os mais preocupantes no que diz respeito à disseminação e contágio da tuberculose (Wood *et al.*, 1992; O' Reilly e Daborn, 1995; Garcia e Gutiérrez, 1996b).

Justificam-se assim, em determinados casos, a utilização de provas sorológicas complementares. A mais importante é a técnica de ELISA indirecto que se baseia na detecção de anticorpos séricos específicos. Nesta prova utilizam-se diferentes antigénios, como a a PPD mamífera (bovina) (Garcia e Gutiérrez, 1996b), e os antigénios proteicos ESAT-6, CPF-10, MPT63, MTB70, MPB83, TB 10.4, PE 5, PE 13 que foram reconhecidos como desencadeadores de uma resposta humoral específica (Lyashchenko *et al.*, 1998; Lightbody *et al.*, 2000; McNair *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2006). Entre estes antigénios destaca-se o MPB70, uma proteína de secreção de algumas estirpes de *M. bovis* e um dos componentes da PPD, utilizado na espécie caprina (Acosta *et al.*, 2000, Marassi *et al.*, 2009).

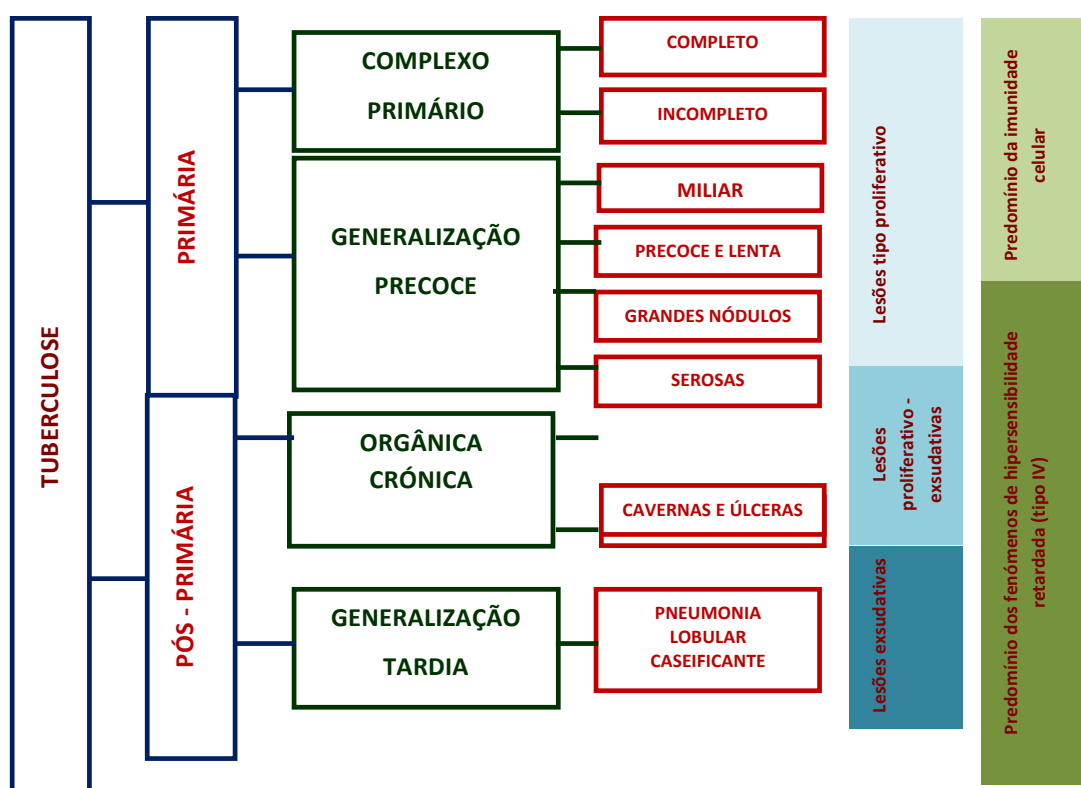
Há muito tempo que se sabe que a inoculação de tuberculina produz um aumento do título de anticorpos séricos nos animais com tuberculose, fenómeno conhecido por resposta anamnésica. Devido a este facto, comprovou-se que, quando se realiza a prova de ELISA 15 a 20 dias depois da tuberculinização (ELISA anamnésico) aumenta a sensibilidade da técnica (Garcia e Gutiérrez, 1996b).

No entanto, a utilização de provas ELISA com apenas um antigénio demonstrou que a atividade dos anticorpos para diferentes antigénios desenvolve-se em fases diferentes durante o curso da infecção (Kwok *et al.*, 2010). O que levou à necessidade de desenvolver métodos que incluíssem vários antigénios de modo a detectarem simultaneamente a atividade dos anticorpos nas várias fases da infecção. Nesse contexto foi desenvolvida uma prova ELISA para a detecção da infecção por *M. bovis*, o *Enfer Chemiluminescent Multiplex ELISA System* (Enferplex®, Newhall, Ireland) e adaptada a caprinos, obtendo-se elevadas sensibilidades e especificidades. Reconhece-se porém a necessidade de estudos adicionais nesta espécie que validem a prova (Shanahan *et al.*, 2011, Shuralev *et al.*, 2012).

## 2.4.2. Diagnóstico *post-mortem*

### 2.4.2.1. Diagnóstico anatomopatológico

O exame e identificação macroscópica das lesões de tuberculose caprina permite realizar um diagnóstico presuntivo da doença (Sánchez *et al.*, 2008). Bernabé e colaboradores (1991a; 1991b; 1996) estabeleceram claramente o quadro lesional da tuberculose caprina, classificando-a em diferentes fases, segundo os critérios estabelecidos por Kitt e Schulz (1985) para a tuberculose bovina (Figura 6).



**Figura 6-** Quadro lesional da tuberculose caprina (Segundo Bernabé *et al.*, 1991a; 1991b;1996).

O quadro morfológico é variado e depende de vários factores como a virulência do bacilo, do estado de saúde do animal e da existência ou não de reinfecção. Segundo a evolução e características morfológicas podemos encontrar quadros de tuberculose primária ou pós-primária. A tuberculose primária ocorre após o

primeiro contacto com o agente, é caracterizada por lesões de tipo proliferativo (i.e. granulomas) e é mais frequente em rebanhos com baixa incidência da doença. Por sua vez, a tuberculose pós-primária, é caracterizada por lesões exsudativas (i.e. grandes áreas de necrose; tuberculose cavitária) e é mais frequente em rebanhos com elevada incidência da doença (i.e. rebanhos sem saneamento em zonas endémicas) (Bernabé et al., 1996).

Assim, à necropsia podem observar-se nódulos ou granulomas de diferentes tamanhos, com grandes focos de necrose de caseificação (Perea *et al.*, 2005, Sanchez *et al.*, 2011). Como a principal via de entrada é a aerógena, o complexo primário encontra-se sobretudo nos pulmões e gânglios mediastínicos. Numa elevada percentagem de casos, os complexos primários são incompletos, pelo que as lesões podem ser de mais difícil detecção (Bernabé *et al.*, 1996). A disseminação por via linfohematógena durante a fase de generalização precoce provoca o aparecimento de novas lesões nos pulmões e outros órgãos (Bernabé *et al.*, 1996; Perea *et al.*, 2005). Assim, podem surgir lesões granulomatosas no intestino (que deverão ser distinguidas das lesões de complexo primário digestivo), especialmente ao nível da válvula ileocecal, e no fígado, baço e gânglios mesentéricos (Bernabé *et al.*, 1996; Perea *et al.*, 2005). Nesta fase, provocada pela chegada ao mesmo tempo de grande número de bacilos a um determinado órgão, encontram-se lesões de tuberculose miliar, o quadro mais frequente de generalização precoce. Já a chegada do agente, em diferentes momentos, provoca quadros de tuberculose precoce e lenta, e, com a veiculação dos bacilos por via retrógrada, podem surgir lesões de tuberculose perlácea das serosas.

Quando ocorre a reactivação ou reinfeção pelo bacilo, por diminuição das defesas ou aumento da virulência deste, surgem as lesões de tuberculose pós-primária. A tuberculose orgânica crónica é caracterizada pela presença de extensos centros de necrose e processos de caseificação mais intensos. A tuberculose acinodular é o quadro lesional mais frequente nesta fase devido à disseminação da lesão por via intracanalicular e por contiguidade entre os alvéolos. Porém, com a liquefacção desses focos de necrose, por acção enzimática, pode ocorrer a destruição das paredes bronquiais, formando-se cavernas e, com a posterior disseminação intracanalicular, úlceras nos bronquios e traqueia. Finalmente na fase de generalização tardia, podemos encontrar lesões de pneumonia lobular caseificante (Bernabé *et al.*, 1996) e, devido à disseminação via linfohematogena, lesões na glândula mamária (Perea *et al.*, 2005) e rim (Bernabé *et al.*, 1991b).

É frequente encontrar diferentes tipos de lesões no mesmo animal (Bernabé *et al.*, 1991a). No entanto, é importante ter em atenção que, por vezes, existem lesões

muito pequenas que podem passar despercebidas o que pode comprometer o diagnóstico da doença (Garcia e Gutiérrez, 1996b; Sánchez *et al.*, 2008). Assim, é de extrema importância a realização de uma inspeção rigorosa dos pulmões e intestinos e, sobretudo, de todos os gânglios associados aos aparelhos respiratório e digestivo, seccionando-os transversalmente (Bernabé *et al.*, 1996). Impõe-se ainda o diagnóstico diferencial com outras doenças como a linfadenite caseosa, pneumonias parasitárias e abscessos (Sánchez *et al.*, 2008).

De salientar também que as lesões macroscópicas descritas em *M. bovis* (Crawshaw *et al.*, 2008; Sharpe *et al.*, 2010) são similares às encontradas em *M. caprae* (Álvarez *et al.*, 2008; Bezos *et al.*, 2010).

O escasso conhecimento que a maioria dos médicos veterinários têm sobre a tuberculose nos caprinos pode, também, levar a diagnósticos errados e até alguma incredulidade face às intensas manifestações clínicas e lesionais que pode ter esta doença, contrariamente aos quadros de tuberculose bovina, que nos últimos anos, praticamente cursam sem a presença de sintomas (Garcia e Gutiérrez, 1996b).

#### **2.4.2.2. Diagnóstico histológico**

O diagnóstico macroscópico deve ser confirmado com a análise histopatológica das amostras e a demonstração de bacilos álcool-ácido-resistentes com a coloração de Zielh-Neelsen (ZN) (Garcia e Gutiérrez, 1996b; Ulrichs *et al.*, 2005). Uma alternativa ao ZN são as técnicas de imunocitoquímica, principalmente a avidina-biotina-peroxidase já estudada na tuberculose caprina (Garcia e Gutiérrez, 1996b; Sánchez *et al.*, 2008, 2011). Esta técnica permite detectar restos de micobactérias, micobactérias com alterações na parede celular e micobactérias livres (Ulrich *et al.*, 2005).

Segundo alguns autores, na tuberculose caprina, podemos encontrar três tipos de lesões microscópicas: proliferativas (i.e. granuloma tuberculoide), proliferativa – exudativa e exudativa (tuberculose cavitária) (Tabela 6).

**Tabela 6** – Tipos de lesões microscópicas encontrados na tuberculose caprina

(Segundo Bernabé *et al.*, 1991; Garcia e Gutiérrez, 1996b, Sanchez *et al.*, 2011).

<b>Lesão proliferativa (granumoma tuberculoide)</b>	<b>Lesão proliferativa - exsudativa</b>	<b>Lesão exsudativa (Tuberculose cavitária)</b>
Granulomas de pequeno diâmetro com reduzida quantidade de necrose central devido a caseificação secundária. Esses granulomas calcificados são rodeados por células epitelioides e algumas células gigantes de Langhans, linfócitos e uma cápsula conjuntiva cujo grau de desenvolvimento depende da fase da doença. Reduzido nº de bacilos, com localização intracelular (células gigantes e epitelioides).	Massas com extensa necrose de caseificação e, por vezes, calcificadas. Estas massas estão aumentadas pela inclusão de pequenos granulomas periféricos, constituídos por um infiltrado difuso de células epitelioides, células gigantes de Langhans e linfócitos, rodeados por uma substância proteínacea (plasma coagulado).	Necrose por caseificação primária. Grandes porções do parenquima pulmonar com necrose sem calcificação, rodeada por um infiltrado celular específico ou inespecífico e grandes áreas com plasma coagulado. Padrão de pneumonia fibrinosa e grande quantidade de bacilos em localização intra e extracelular.

#### 2.4.2.3. Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico bacteriológico tradicional pode ser feito a partir de amostras patológicas de animais vivos (i.e. biopsias, exsudados, fezes, urina, expectoração), embora nos animais de produção seja impraticável, ou, quase sempre, a partir de animais mortos (Vicente, 2004). As amostras mais indicadas para enviar para laboratório são as lesões granulomatosas características, o que salienta a importância da sua correcta identificação e colheita. Deve, por isso, fazer-se a secção e abertura das lesões para um diagnóstico macroscópico mais eficaz (Garcia e Gutiérrez, 1996b).

A confirmação bacteriológica de tuberculose nos caprinos começa pela visualização de BAAR (bacilos álcool-ácido-resistentes) em esfregaços obtidos a partir das lesões corados com Ziehl – Neelsen (ZN) (Garcia e Gutiérrez, 1996b; Duarte, 2008). De seguida procede-se à descontaminação da amostra. Esta fase é importante, uma vez que, o lento desenvolvimento das micobactérias patogénicas pode permitir o crescimento no meio de cultura de outras bactérias presentes na amostra (Martin e León, 1998; Vicente, 2004), e também porque o próprio procedimento de necropsia favorece a contaminação das amostras (Garcia e Gutiérrez, 1996b).

Existem vários meios de cultura que podem ser utilizados para o isolamento de *M. bovis* e *M. caprae*. Como são disso exemplo, meios líquidos como o sistema radiométrico Bactec 460 (Becton Dickinson, EUA), e os meios sólidos: Löwestein-

Jensen com ou sem TCH (hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico), Löwestein-Jensen com piruvato, Stonebrink, Tharsis-modificado B82, Middlebrook e Coletsos (Garcia e Gutiérrez, 1996b, Vicente, 2004, Duarte, 2008).

Uma vez isolada a micobactéria, esta é submetida a um complexo e lento estudo microbiológico baseado nas 22 características, microbiológicas e bioquímicas, seleccionadas por Wayne e Kubica no Manual Bergey's de Bacteriologia Sistemática (1986) para identificação da espécie (Martín e León, 1998; Vicente, 2004).

#### **2.4.2.4. Provas de diagnóstico molecular**

Os métodos de tipificação referidos, fundamentalmente baseados em aspectos fenotípicos, são morosos e fastidiosos dado o lento crescimento das micobactérias patogénicas e a quantidade de provas que são necessárias executar (Martín e León, 1998; Olive e Bean, 1999). O surgimento de técnicas de biologia molecular permite encurtar o tempo de resposta laboratorial (Duarte, 2008), minimizar os problemas causados pela não tipificação, pela baixa reprodutividade e pela impossibilidade de estabelecer dados fiáveis de classificação (Olive e Bean, 1999), para além de possuir potencialidades de utilização em estudos epidemiológicos (Gómez *et al.*, 1998). O que faz com que as diferentes técnicas moleculares de diagnóstico sejam vistas com crescente entusiasmo (Duarte, 2008).

A sua utilização no âmbito do diagnóstico da tuberculose em ruminantes faz-se ao nível de três aspectos : detecção do agente patogénico em tecidos ou secreções do hospedeiro (Garcia e Gutiérrez, 1996b), tipificação de estirpes e quantificação da resposta imunitária (Sánchez, 2008).

Os procedimentos de diagnóstico baseados na PCR (*Polimerase Chain Reaction*) são os mais utilizados (Garcia e Gutiérrez, 1996b), desde as suas primeiras aplicações na detecção de ADN de *M. bovis* em amostras de tecidos animais (Cousins *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1994; Wards *et al.*, 1995; Liébana *et al.*, 1996). Taylor e colaboradores (2007b) demonstraram que a técnica PCR baseada na amplificação do gene IS 1081, é capaz, a partir de amostras colhidas em matadouro, de detectar um único genoma de *M. bovis*. As potencialidades da PCR podem ser, assim, comparáveis à do isolamento, mas também, a técnicas imunohistoquímicas ou o próprio Ziehl-Neelsen, como comprovaram alguns autores através da adaptação desta

técnica a amostras previamente fixadas e incluídas em parafina, permitindo, inclusive, a realização de estudos retrospectivos (Coetsier et al., 2000; Miller et al., 2002).

Bakshi e colaboradores (2007) provaram, ainda, ser possível diferenciar diferentes micobacterias através do PCR. A técnica mais recentemente aplicada no diagnóstico da tuberculose em ruminantes domésticos e selvagens é a quantificação da produção de ARNm de IFN- $\gamma$  mediante RT-PCR (Reverse transcriptase – PCR) (Harrington et al., 2007).

**Tabela 7-** Técnicas de biologia molecular utilizadas no âmbito da tuberculose animal (Baseado em Gómez *et al.*, 1998; Vicente 2004).

<b>Técnica</b>	<b>Descrição da técnica</b>
<b>Sondas moleculares</b>	São fragmentos de ácidos nucleicos cuja sequência de nucleotídeos é complementar de outra, específica do complexo, género ou espécie. Não necessita de cultivo prévio, embora tenha sensibilidade variável. A mais utilizada é a <i>Southern blot</i> , onde um fragmento de ADN, com determinada sequência, pode ser identificado num conjunto de fragmentos através electroforese, pela hibridação com uma sonda complementar marcada radioactivamente, visualizando-se através de autorradiografia.
<b>PCR</b>	Permite a amplificação de sequências específicas de ADN, a partir de oligonucleótidos seleccionados, os <i>primers</i> , aos quais se vão unindo nucleotídeos por acção da ADN polimerase, até se formarem cadeias com um comprimento detectável. Pode detectar quantidades insignificantes de ADN mas requer o conhecimento prévio das sequencias e o seu exito depende da adequada selecção dos primers.
<b>RFLP</b>	Compreende a utilização de enzimas de restrição (i.e. <i>Pvu II</i> , <i>Alu I</i> ) e de <i>Southern Blot</i> . Baseia-se no estudo do ADN micobacteriano completo e do nº de vezes que se repete determinada sequencia de inserção ( <i>IS</i> , <i>Insertion Sequence</i> ), bem como da sua disposição no genoma, cortando o ADN problema mediante enzimas de restrição que geram fragmentos de comprimento variável. As sequências mais utilizadas são: IS 1081, DR (direct repeat), PGRS (polymorphic GC-rich sequence), VNTR (variable number tandem repeat), mas principalmente a sequência IS 6110, por apresentar um nº variável de cópias entre as diferentes espécies do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
<b>Spoligotyping</b>	Baseado na variação que existe numa região denominada DR (direct repeat) específica do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , identificando uma serie de “espaçadores” conhecidos dessa região (os DVR, <i>direct variant repeat</i> ). Em primeiro lugar é realizado um PCR com dois <i>primers</i> complementares, um deles marcado com biotina. Os produtos resultantes vão contactar com uma membrana com os <i>espaçadores</i> do locus DR, produzindo-se a hibridação. Então é adicionada uma enzima que se liga aos produtos do PCR marcados com biotina, com um líquido de detecção que emite luz na presença dessa enzima, permitindo a visualização por autorradiografia. Finalmente, por via informática, analisam-se os resultados para estabelecer relações filogenéticas entre estirpes. Esta técnica permite obter um padrão característico para cada micobactéria do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Podendo assim ser utilizada na tipificação e identificação destes microorganismos.

No entanto, várias outras técnicas e métodos provaram ser importantes (tabela 7), especialmente na tipificação das estirpes de *Mycobacterium* no âmbito da epidemiologia molecular, como as sondas moleculares, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e o “spoligotyping” (*Spacer Oligonucleotide typing*) (Vicente, 2004). Com especial interesse para estas duas últimas técnicas, sendo hoje, o “spoligotyping” recomendado na realização de provas de “screening” em grande escala, onde detecta com rapidez estirpes de *M. bovis* ou *M. caprae*, e o RFLP que permite uma melhor diferenciação entre essas estirpes (Sánchez *et al.*, 2008).

## 2.5. Controlo

A ausência de dados epidemiológicos suficientes faz com que não estejam previstos planos de erradicação da tuberculose caprina (Laje *et al.*, 2006) na maior parte dos países do mundo. Mesmo no caso paradigmático de Espanha, onde a doença é endémica em todo o território, as diferentes comunidades autónomas tem diferentes abordagens à doença desde a ausência de campanhas de saneamento até ao saneamento de todo o efectivo caprino (Pardo *et al.*, 2008, Napp *et al.*, 2013). Apenas nas regiões autónomas da Andaluzia, Castilha e Leão, Murcia e nas ilhas Canárias se implementaram planos regionais de controlo da doença (Napp *et al.*, 2013), controlos que também são feitos de forma pontual na Catalunha e na região de Madrid (Balseiro, 2001). A região de Murcia, onde se realizam campanhas oficiais de controlo desde 1995, é a única região espanhola com dados oficiais, apresentando em 2007, 22,18% de explorações com animais positivos, e uma prevalência anual de 5,2% (Consejería de Agricultura y Agua *in* Pardo *et al.*, 2008). O programa estabelecido nesta região, está definido por legislação semelhante e alguma comum à aplicada para a espécie bovina, através da ordem 30/03/2005 (B.O.R.M. 11/04/1995) alterada pela ordem 1/7/2005 (B.O.R.M. 20/7/2005) e pela ordem 21/5/2008 (B.O.R.M. 2/6/2008), do Real Decreto 1328/2000 (B.O.E. 8/07/2000) e ainda na ordem 13/07/2000 (B.O.R.M. 26/07/2000). Baseando-se no diagnóstico mediante tuberculinização intradérmica, com abate dos animais positivos e a consequente indemnização aos produtores.

Na generalidade da União Europeia apenas estão previstos programas de erradicação para a tuberculose bovina, que são aplicados, desde a publicação da Directiva do Conselho 64/432 EEC de 26 de Junho de 1964. Quanto aos caprinos, o Regulamento CE 853/2004 prevê que sejam inspeccionados e testados relativamente

à tuberculose sempre que sejam mantidos juntamente com os bovinos. Este aspecto já foi considerado na elaboração de alguns programas sanitários de estados membros, como por exemplo na Espanha, França e Inglaterra, mas ainda não está previsto no último plano nacional de erradicação da tuberculose bovina. Em França inclusivé, a legislação estabelece simultâneamente medidas de combate à tuberculose bovina e caprina, onde é obrigatório que todos os caprinos com mais de seis semanas façam o teste de IDT, se estiverem inseridos em explorações de bovinos não indemnes à tuberculose ou em explorações com bovinos e o seu leite se destine a ser vendido sem um tratamento térmico prévio (Ordem 19/8/2009 que modifica a ordem 15/9/2003 do JORF nº226 de 30 de Setembro).

Na União Europeia a vigilância da tuberculose nos caprinos é feita essencialmente na inspecção sanitária *post-mortem* nos matadouros e, esporádicamente, através exames de bacteriológicos requisitados por clínicos (Comissão Europeia, 2002; EFSA, 2009). Desse modo foram notificados casos de tuberculose caprina por *M. bovis* em França, Inglaterra e Portugal durante o ano de 2007 (EFSA, 2009).

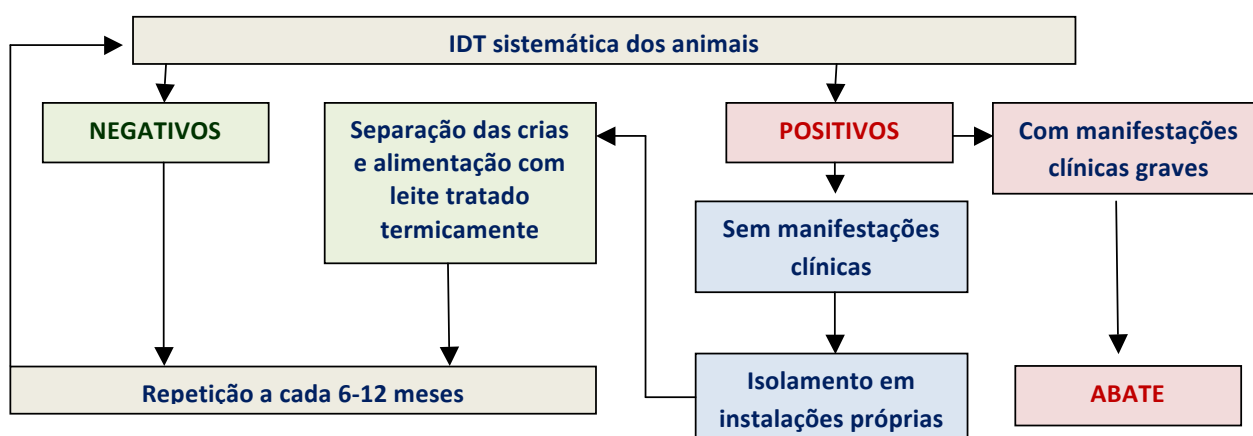
Numa campanha de erradicação da tuberculose, qualquer que seja o método utilizado, a espécie animal alvo ou a zona geográfica em que se aplique, devem ser tomados em consideração ou seguintes critérios, sob pena de esta se destinar ao fracasso:

- Tuberculinização (ou prova alternativa) de todos os animais a intervalos regulares;
- Rápida separação e sacrifício dos animais positivos;
- Limpeza e desinfecção das instalações e objectos contaminados;
- Quarentena dos rebanhos que entraram em contacto com esses animais;
- Rastreio dos movimentos anteriores dos animais positivos para encontrar a origem e a possível disseminação da doença (O'Reilly, 1969); pelo que deve existir identificação individual obrigatória e um controlo completo e preciso da movimentação animal;
- Pagamento de indemnizações aos proprietários pelo sacrifício dos animais;
- Estabelecimento e manutenção de áreas livres da infecção, com o objectivo de as estender a todo o país;
- Suficiente vontade, meios e pessoal para cumprir estes critérios satisfatoriamente (Huchzermeyer *et al.*, 1994).

É nestes critérios que se baseiam os esquemas tradicionais de erradicação e controlo da tuberculose bovina e os exemplos referidos da tuberculose caprina. Estes critérios devem ser adaptados aos meios disponíveis e às condições sociais e económicas existentes na região ou inclusivamente ao à prevalência no próprio rebanho (Garcia, 1996).

Existem ainda meios alternativos de controlo sugeridos por outros autores. Um deles, com provas dadas desde finais do século XIX, é o método de Bang (Figura 8), ao qual já foram sugeridas alterações para se adaptar à realidade da tuberculose caprina em certas regiões espanholas por Garcia (1996) e por Pardo e colaboradores (2008).

Outro método alternativo possível, em áreas endémicas e de elevada prevalência, sugerido por Garcia (1996), seria a realização periódica do teste ELISA e eliminação dos animais positivos. Após a redução da prevalência, comprovada por ELISA e IDT, proceder-se-ia à eliminação de todos os animais positivos a uma ou outra técnica.



**Figura 7** – Método de Bang para controlo da tuberculose animal.

A utilização de vacinas na luta contra a tuberculose animal, nomeadamente com a estirpe BCG de *M. bovis*, foi alvo de alguma controvérsia no passado. De tal modo que em 1959 a OMS/FAO recomendou o abandono da vacinação com a BCG. Além do mais esta sensibiliza o animal contra a tuberculina impedindo a aplicação deste método de controlo.

Qualquer que seja o plano de erradicação terá ainda de ter em conta a existência de infecções mistas com paratuberculose na escolha do(s) método(s) de diagnóstico adequado(s) a implementar (Bezoz *et al.*, 2010).

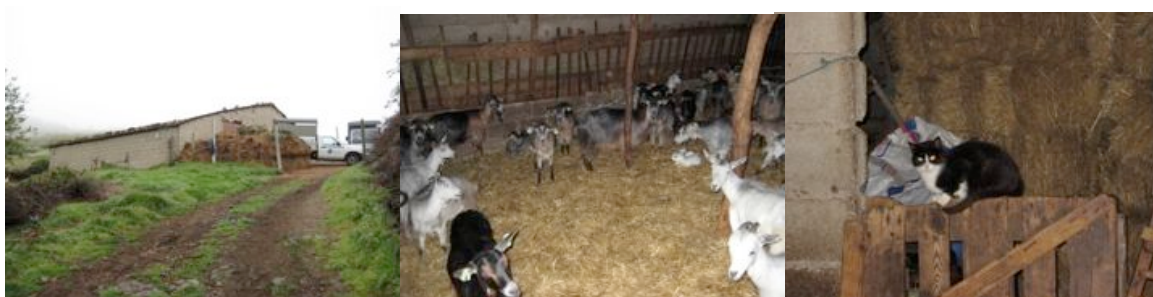
Importa ainda referir que qualquer programa de erradicação da tuberculose aplicado à espécie caprina estará condicionado pela existência de grandes excretores de bacilos, pela elevada possibilidade de contágio e pela rápida evolução da doença nesta espécie (Garcia, 1996).

### 3. Estudo de Caso

Neste trabalho apresenta-se uma descrição do quadro clínico, anatomopatológico e histopatológico, bem como alguns dados epidemiológicos relevantes, encontrados em dois surtos tuberculose caprina ocorridos na área de intervenção da ACRIGA – OPP (Organização de Produtores Pecuários da Associação de Criadores de Gado e Agricultores). Faz-se, ainda, uma discussão crítica de aspectos ligados ao diagnóstico e medidas de controlo que podem ser aplicadas no âmbito da tuberculose caprina.

Apresentam-se dois casos distintos (Figura 8): um ocorrido em Pombares, no concelho de Bragança (Exploração 1), acompanhado entre Abril de 2007 e Maio de 2008, e um segundo, em Lamas concelho de Macedo de Cavaleiros (Exploração 2), acompanhado entre Março e Julho de 2012.

#### EXPLORAÇÃO 1



#### EXPLORAÇÃO 2



**Figura 8** – Imagens das explorações em estudo.

### 3.1. Caracterização das explorações

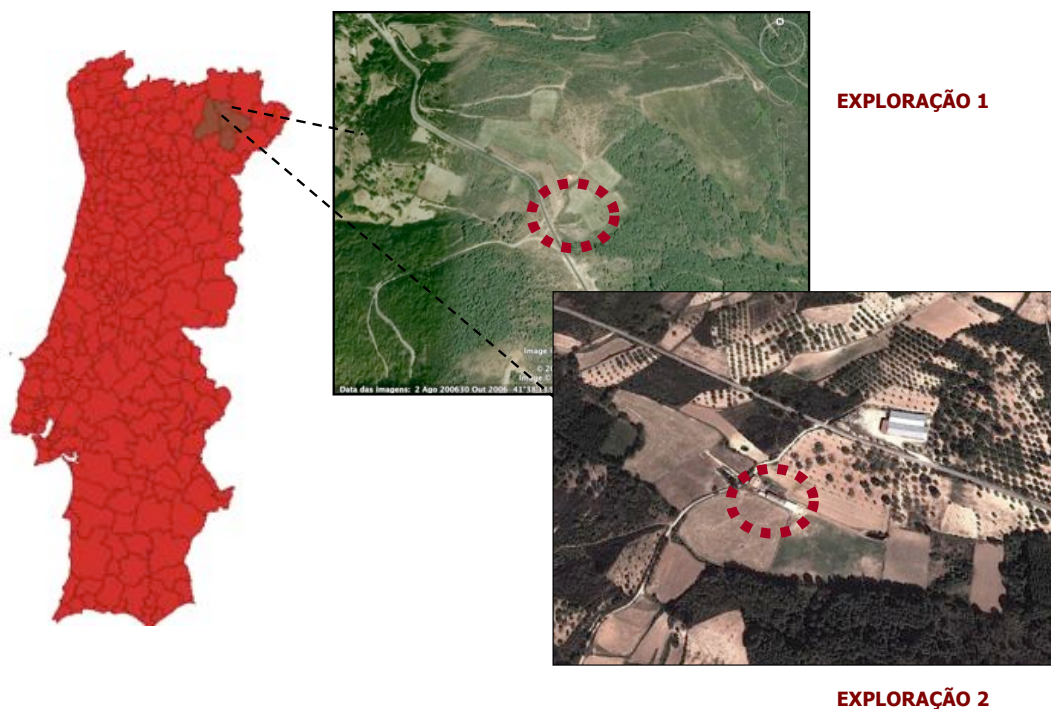
De forma a simplificar a exposição apresenta-se uma tabela resumo com as informações relevantes em cada um dos casos (Tabela 8).

**Tabela 8**– Informação epidemiológica relevante das explorações em estudo.

	<b>Rebanho 1</b>	<b>Rebanho 2</b>
<i>Nº de animais</i> <i>(última intervenção sanitária)</i>	<b>127 animais</b> (2/3/2007) 103 cabras 5 bodes 14 cabritas (reposição) 5 cabritos (reposição)	<b>149 animais</b> (23/9/2011) 144 cabras 5 bodes
<i>Raça</i>	Serrana e cruzadas	Murciana – Granadina (e 30 cabritas Saanen )
<i>Aptidão</i>	Mista (sobretudo carne)	Leite
<i>Sistema de produção</i>	Semi-extensivo	Intensivo
<i>Ordenha mecânica, luz elétrica e água canalizada</i>	Não	Sim
<i>Classificação sanitária (Brucelose)</i>	B3 (indemne)	B3 (indemne)
<i>Contacto com outros efetivos</i>	Não	Não
<i>Entrada de animais de outras explorações</i>	Nenhum nos últimos 5 anos.	149 cabras Saanen “troçadas” em Setembro de 2011 por cabras Murcianas.

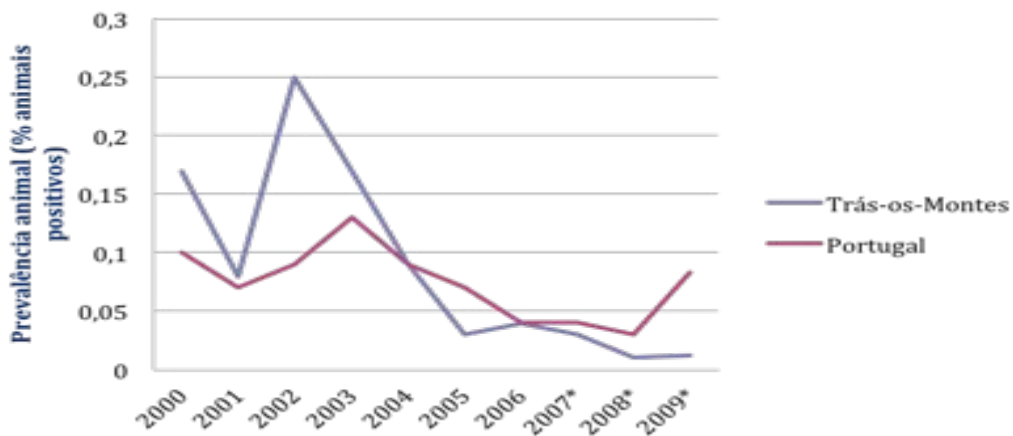
A exploração 1 localizava-se num local relativamente isolado, na encosta sul da serra de Nogueira, sem qualquer casa ou exploração num raio de pelo menos 1000 metros (Figura 9) . Os animais não tinham contato com outros ruminantes domésticos, nem partilhavam as suas pastagens. No entanto partilhavam pastagens, e muitas vezes mantinham contato estreito, com animais silváticos, como os veados (*Cervus elaphus*), corços (*Capreolus capreolus*), javalis (*Sus scrofa*) e cabras montesas (*Capra pyrenaica*).

A exploração 2 era uma exploração intensiva de aptidão leite, sem contato com qualquer outro efetivo animal (doméstico ou silvático). O efetivo caprino original da exploração de raça Saanen tinha sido substituído em Setembro de 2011 por um de raça Murciana-Granadina adquirido numa exploração da região Centro (Castro Daire) e sendo originalmente oriundo de Espanha. A informação sanitária do país de origem atestava que a exploração de origem era oficialmente indemne à brucelose (B4) mas não tinha informação sanitária quanto à tuberculose.



**Figura 9** - Localização das explorações de caprinos em estudo (no mapa encontra-se a sombreado a área de actuação da ACRIGA-OPP; Fonte das fotografias: Google Earth).

Quanto à situação da tuberculose animal na região, apenas se conhecem os dados oficiais da tuberculose bovina (Figura 10). É importante salientar que na área de intervenção da ACRIGA não se registou nenhum caso nos últimos 30 anos.



**Figura 10** – Prevalência da tuberculose bovina (em % de animais positivos) em Trás-os-Montes e em Portugal desde o ano 2000. \* dados da Região Norte (Fonte: Fonseca, 2009, 2011).

### 3.2. História clínica

A assistência veterinária das explorações era garantida pelos médicos veterinários da ACRIGA – OPP e incluía campanhas semestrais de profilaxia médico-sanitárias, bem como a resposta a solicitações esporádicas do produtor para resolução, sobretudo, de problemas de rebanho.

Para uma melhor contextualização e compreensão da história clínica, das decisões tomadas e desta descrição de caso, apresenta-se esquematicamente um cronograma que resume os dados relevantes relativos aos casos em estudo (Figura 11).

#### EXPLORAÇÃO 1



#### EXPLORAÇÃO 2



**Figura 11-** Cronograma da história clínica dos efetivos.

(\*Colheita e envio de amostra para o LNIV)

### 3.3. Quadro clínico

A doença afectou caprinos de todas as idades e evoluiu do ponto de vista clínico de forma semelhante em todos os animais afectados. O sinal clínico que marcava invariavelmente o início das manifestações da doença era uma tosse seca, bastante marcada, que se tornava crónica, com os animais a aumentarem paulatinamente o esforço respiratório (dispneia). A que se seguiam anorexia, anemia e emagrecimento progressivo, na maior parte dos casos sem diarreia. Os períodos de

hipertermia (muitas vezes superiores a 41°) alternavam com períodos afebris. À auscultação os animais apresentavam crepitações pulmonares (sons “cavernosos”), por vezes, em fases adiantadas da doença audíveis mesmo sem estetoscópio. A perda da condição corporal era acompanhada pelo acentuar do pelo seco e quebradiço e diminuição da produção de leite (Figura 12).

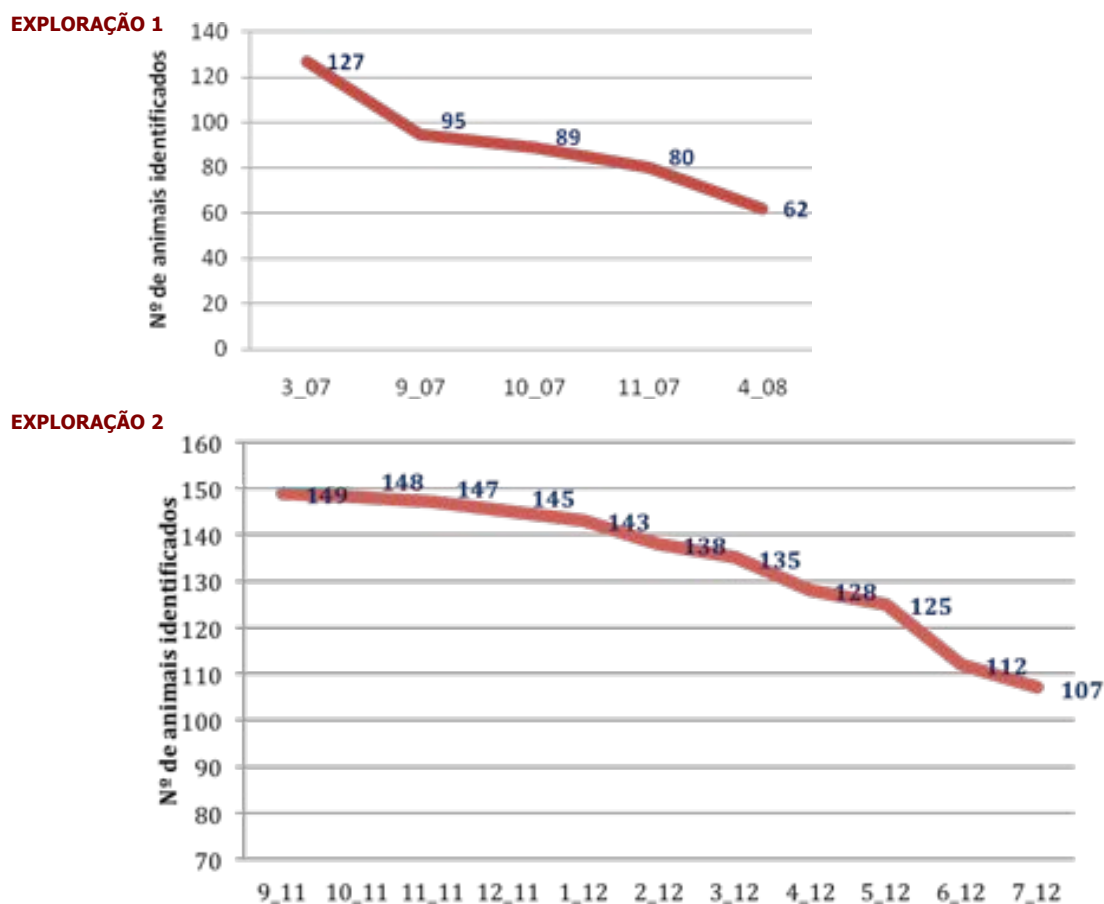
A morte ocorria num período de 4 a 6 semanas após o surgimento dos primeiros sintomas. A taxa de letalidade nos animais com doença clinicamente detectável foi de 100%.



**Figura 12** – Exame clínico de um caprino: auscultação, medição da temperatura corporal e avaliação da condição corporal.

A gravidade dos surtos pode também ser demonstrada pelo número de animais afetados (Figura 13). Na exploração 1, considerando as observações clínicas e necropsias realizadas, durante o período de acompanhamento do surto, a taxa de mortalidade da doença foi de 34,74% (33/95). Este número pode pecar por defeito, uma vez que o surto começou em Abril de 2007, e o proprietário só nos informou da ocorrência em Setembro de 2007. Se tivermos em consideração o período total do surto, poderíamos eventualmente falar de uma taxa de mortalidade de cerca de 50%.

Por sua vez na exploração 2 a taxa de mortalidade observada foi de 22,46% (31/138) durante os 4 meses de observação (e cerca de 28 % durante todo o surto).



**Figura 13** - Evolução da população de caprinos nos efetivos

Para analisar a taxa de mortalidade registada, a população de caprinos em estudo foi dividida em 6 grupos etários, considerando a reposição anual do efetivo. A taxa de mortalidade variou em função do grupo etário ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 9). A taxa de mortalidade foi nula nos animais com 5-17 meses de idade (1º grupo), em todas as explorações, uma vez que após o diagnóstico da doença e perante a perspectiva de contágio ou abate total não se procedeu à reposição dos efetivos e a maioria os animais jovens eram abatidos para consumo. A taxa de mortalidade do efetivo variou em função da exploração ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 9** – Taxa de mortalidade dos efetivos por escalões etários durante os períodos de acompanhamento do surto

Idade (meses)	Exploração 1	Exploração 2	Total
5-17	0,0% <sup>a</sup> (0/15)	0,0% <sup>a</sup> (0/0)	0,0% <sup>a</sup> (0/15)
18-30	15,4% <sup>b</sup> (2/13)	57,1% <sup>b</sup> (4/7)	30,0% <sup>b</sup> (6/20)
31-43	55,0% <sup>c</sup> (11/20)	31,6% <sup>c</sup> (6/19)	43,6% <sup>c</sup> (17/39)
44-56	37,5% <sup>c</sup> (6/16)	21,3% <sup>c,d</sup> (10/47)	25,4% <sup>b,d</sup> (16/63)
57-69	50,0% <sup>c</sup> (3/6)	13,0% <sup>d</sup> (6/46)	17,3% <sup>d</sup> (9/52)
> 70	44,0% <sup>c</sup> (11/25)	26,3% <sup>c</sup> (5/19)	36,4% <sup>b,c</sup> (16/44)
<b>Efetivo</b>	<b>34,7%<sup>x</sup></b> <b>(33/95)</b>	<b>22,5%<sup>y</sup></b> <b>(31/138)</b>	<b>27,5%<sup>y</sup></b> <b>64/233</b>

a≠b, a≠c, a≠d, para P≤0,05 (entre linhas, mesma coluna)

b≠c, b≠d, para P≤0,05 (entre linhas, mesma coluna)

c≠d, para P≤0,05 (entre linhas, mesma coluna)

x≠y, para P≤0,05 (entre colunas).

Na exploração 1, a taxa de mortalidade aumentou paulatinamente nos três primeiros grupos etários (P≤0,05). Os valores mais elevados verificaram-se entre os animais com mais de 31 meses de idade. Na exploração 2, a taxa de mortalidade foi máxima entre os animais com 18-30 meses de idade (P≤0,05). As diferenças observadas entre os grupos etários mais velhos, ainda que por vezes significativas (P≤0,05), não formaram um padrão claro. Globalmente, tal como referido na bibliografia, a mortalidade atingiu animais adultos de todas as idades, sem diferenças significativas entre os grupos mais afetados (P≤0,05).

Tratando-se de dois casos distintos, separados no tempo e no espaço, o contexto epidemiológico, a raça, a presença de doenças concomitantes, tipo de manejo, entre outros podem estar na gênese das diferenças encontradas entre as duas explorações. O conhecimento clínico que temos das explorações permite-nos ainda sugerir como justificação: na exploração 1 a menor mortalidade ocorrida no grupo entre 18-30 meses pode ser atribuída ao bom *status* imunitário e sanitário dos jovens adultos e a consequente resistência a uma nova infecção (i.e. a doença entrou pela primeira vez na exploração). Na exploração 2, efetivo onde com toda a probabilidade a doença já circulava há algum tempo, o grupo entre os 18-30 meses foi o mais atingido, o facto de se tratarem apenas de 4 animais e a menor percentagem registada nos outros grupos pode ser justificada pelo efeito de seleção de animais

mais resistentes á doença que a doença pode ter tido ao longo do tempo nesse efetivo.

Os sintomas descritos são coincidentes com os da bibliografia consultada. Garcia e Gutiérrez (1996) referem como tendo maior valor diagnóstico:

- Elevada mortalidade em animais adultos de todas as idades, sem estacionalidade e distribuídas de forma cadencial ao longo do ano;
- Os animais doentes apresentam um processo crónico que dura desde algumas semanas a vários meses, caracterizado por um emagrecimento progressivo e a presença de sintomas respiratórios na fase final da doença.

Em ambos os casos as observações clínicas iniciais não permitiram ter uma noção tão ampla do quadro clínico tal como aqui se apresenta. Sobretudo porque nas primeiras necropsias de animais com histórico de pneumonia crónica, as lesões evidentes de pneumonia parasitária, enterite parasitária e cisticercose visceral, fornecem um “diagnóstico” e podem ofuscar outras possíveis lesões. Apenas o aparecimento de lesões granulomatosas evidentes no pulmão e gânglios mediastínicos, gerou a suspeita de tuberculose, entre outros processos crónicos até aí tidos em consideração.

No leque de diagnósticos diferenciais foram tidos em conta quadros de:

- |  |  |
|--|--|
| - Broncopneumonia parasitária;                 | - Abscessos em pneumonia por aspiração;                  |
| - Parasitismo;                                 | - Abscesso pulmonar por <i>Trueperella pyogenes</i> ;    |
| - Paratuberculose;                             | - Forma pulmonar da Artrite e Encefalite Caprina (CAEV); |
| - Linfadenite caseosa;                         | - Adenomatose pulmonar;                                  |
| - Tumor intranasal enzoótico;                  | - Actinobacilose   |
| - Pneumonia por pasteurellas e/ou micoplasmas; |  |

Tendo em conta que nas primeiras necropsias não foram registados os dados de forma sistemática (maioritariamente quadros generalizados), far-se-á uma descrição pormenorizada do quadro lesional, mais tarde quando se descreverem as lesões encontradas após o abate.

### 3.3.1. Diagnóstico Imagiológico

Em clínica de caprinos o diagnóstico radiográfico é normalmente impraticável em condições de campo. Para além dos custos associados, da disponibilidade de unidades radiográficas móveis ou fixas não ser corrente e dos conhecidos efeitos nefastos das radiações ionizantes a contenção física ou química de caprinos com quadros de dispneia grave constituem limitações à sua utilização. Segundo Smith e Sherman (2009) o diagnóstico ecográfico segundo os procedimentos descritos por Scott e Gessert (1998) para ovinos podem ser aplicados aos caprinos. O exame ecográfico pode ser feito em estação de preferência com um transdutor linear curvo por causa do estreito espaço intercostal nesta espécie. Previamente deve fazer-se a tricotomia em ambos os lados com 7 cm de largura na faixa de pele caudal à escápula e articulação escápulo-humeral (Figura 14). Após a aplicação de gel ecográfico o tórax é examinado nos planos longitudinal e transversal a partir do 6º ou 7º espaço intercostal. O membro posterior é abduzido e a pele puxada cranealmente para permitir o acesso à região ventral do tórax. O exame entre o 9º e o 10º espaço intercostal permite avaliar o campo pulmonar dorsal (Scott, 2009; Smith e Sherman, 2009).

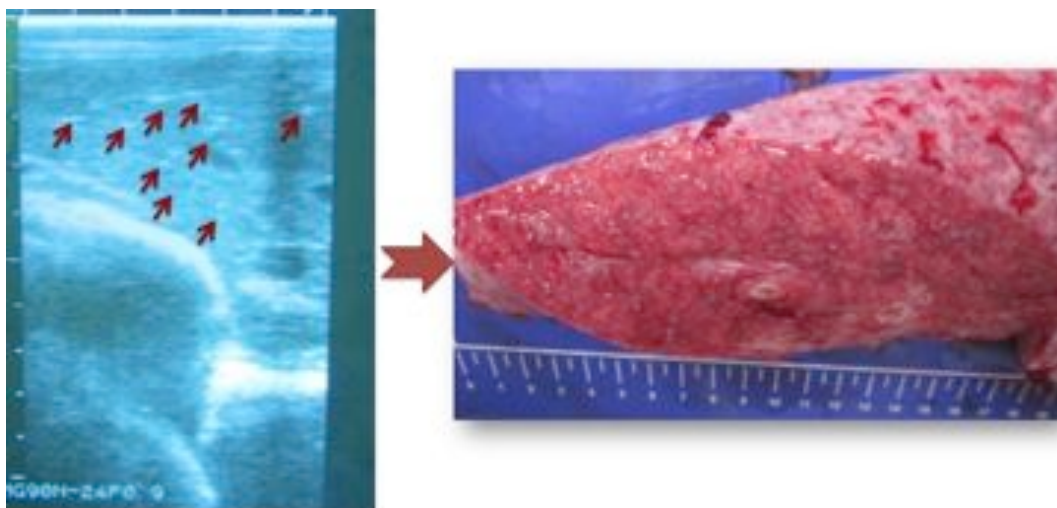
Os pulmões bem ventilados de um animal normal não permitem a penetração do feixe de ultrassons produzindo grande quantidade de ecos de reverberação. Nos pequenos ruminantes o exame ecográfico ao tórax é útil para demonstrar a acumulação de líquido no espaço pleural, abscessos que atingem a pleura, tumores e consolidação por pneumonia intersticial crónica de origem vírica ou bacteriana (Scott e Gessert 1998).



**Figura 14** – Área de exploração ecográfica do tórax nos caprinos e ecografo utilizado.

Na exploração 2, após o início do surto e ainda na ausência de diagnóstico laboratorial foi examinado clinicamente uma fêmea adulta com um quadro de tosse crónica e emaciação progressiva e sujeita a exame ecográfico com um equipamento *Aloka® Echo – Camara SSD- 500* e uma sonda de 5 MHz segundo os procedimentos previamente descritos.

Ao exame ecográfico visualizaram-se pequenas estruturas hiperecogénicas com aproximadamente 1 mm de diâmetro difusas por todo o parênquima pulmonar e hepático. Procedeu-se à eutásia do animal com pentobarbital sódico a 20% (*Eutasil®*) e posterior necropsia onde se visualizaram estruturas granulomatosas miliares (~1mm) no parênquima pulmonar e hepático, procedeu-se à recolha de amostras de lesões para diagnóstico laboratorial (Figura 15).



**Figura 15** – Imagem ecográfica do pulmão (setas indicam os focos hiperecogénicos) e corte à necropsia do lobo pulmonar correspondente.

### 3.4. Diagnóstico laboratorial

Nos dois casos foram encaminhados para o LNIV-Lisboa amostras de fragmento pulmonar e gânglio mediastínico com lesões granulomatosas, com a suspeita clínica de Linfadenite caseosa e Tuberculose. A pesquisa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi negativa. Mas isolou-se *Mycobacterium caprae*, spoligotipo SB157. Na exploração 1 foram feitas 14 análises adicionais (Tabela 10).

A nível laboratorial, o isolamento e identificação das micobactérias são efectuados segundo as recomendações do *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE, 2008) ou segundo manuais de procedimentos nele baseados (figura 14).

O Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) é, no nosso país, o laboratório de referência para o diagnóstico da tuberculose em animais domésticos, silvestres e exóticos.

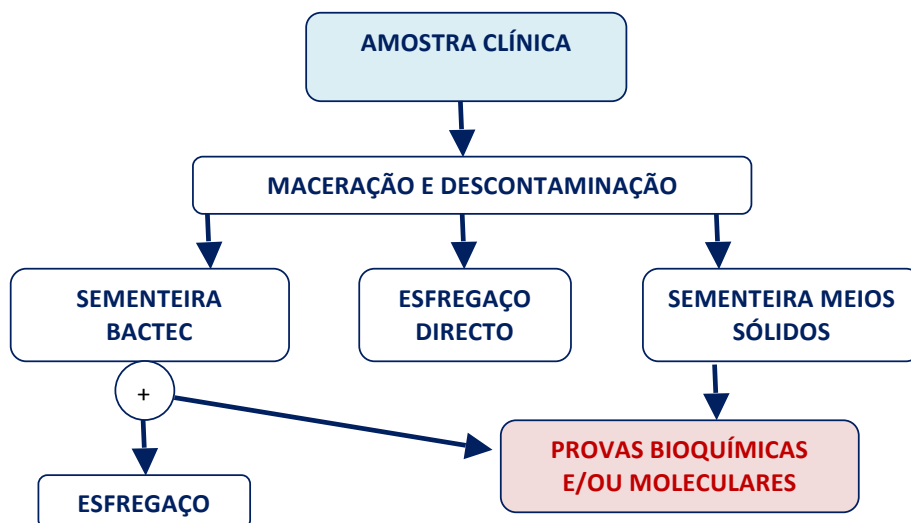
**Tabela 10** – Resumo dos resultados laboratoriais e de campo na exploração 1.

Animal	Idade (meses)	Lesões	IDT	BAAR	Cultura	Espoligotipo
1	48	Gl. med.	+	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
2	48	P, Gl. med., F, Mama	+	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
3	86	Gl. med., Gl mes.	+	-	-	
4	92	P, Gl. med., Gl mes, F, Mama	+	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
5	37	P	+	-	-	
6	31 (Macho)	Gl. med.	+	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
7	92	P, Gl. med., Gl mes.	+	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
8	25	P	Duvidoso	-	-	
9	120	P, Gl. med., Gl mes, F, Mama	+	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
10	11	P, Gl. med., Gl mes,	Não realizada	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
11	11	P	Não realizada	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
12	11	Gl.med.	Não realizada	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
13	11	P, Gl mes.	Não realizada	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
14	11	P	Não realizada	+	<i>M. caprae</i>	SB0157
15	64	P. Gl med	Não realizada	*	<i>M. caprae</i>	SB0157

(Legenda: P- Pulmão; Gl. Med. – Gânglio Mediastínico; F- Fígado; Gl. Mes. – Gânglio Mesentérico).

Em traços gerais o procedimento é o ilustrado na figura 16. Quanto aos meios de cultura utilizados, o meio Bactec 9000 é um meio de cultura líquido comercial que evidência o crescimento bacteriano precocemente pela detecção da utilização do palmitato com carbono radioactivo, o que permite encurtar o tempo de isolamento de uma a duas semanas. Por sua vez, os meios sólidos convencionais são incubados a 37 °C durante um período que pode ir até oito semanas, com a monitorização regular das colónias (Duarte, 2008). Para Garcia e Gutiérrez (1996b) o meio de Coletsos foi, entre os experimentados na tuberculose caprina, aquele em que se verificou melhor crescimento das micobactérias.

As características que podem dar indicação do isolado da amostra ser uma micobactéria pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) são: (a) crescimento lento; (b) colónias não pigmentadas rugosas (excepto *M. canetii*) e a (c) temperatura preferencial de crescimento de 37°C (Duarte, 2008).



**Figura 16-** Principais etapas para o isolamento e identificação de micobactérias no Serviço de Diagnóstico Bacteriológico do LNIV (Fonte: Duarte, 2008)

Os membros deste complexo podem ser distinguidos através de testes bioquímicos (Tabela 11) como a actividade da nitrataze, necessidade de oxigénio, susceptibilidade à TCH (hidrazina do ácido tiofeno-2-carboxílico) e à pirazinamida (PZA), e a actividade da pirazinamidase. O teste de produção da niacina, por ser relativamente simples, também é utilizado, pese embora a sua menor especificidade relativamente aos testes anteriores (Grange *et al.*, 1996).

Porém, é frequente encontrarem-se variações fenotípicas entre estirpes da mesma espécie, o que leva a resultados inconclusivos na identificação. Assim, o LNIV, devido á ambiguidade que pode ser gerada e pela morosidade dos testes bioquímicos, recorre a testes de identificação molecular, como o INNO-LIPA (Innogenetics, Ghent, Belgica) e o Geno Type Mycobacteria (Hain diagnostic, Nerhen, Alemanha) (Duarte, 2008).

**Tabela 11** – Diferenciação do *M. bovis* de outros membros do MTC (Grange *et al.*, 1996)

Espécie e variante	Actividade da nitratase	Necessidade de oxigénio	Susceptibilidade à pirazinamida	Pirazinamidase	Susceptibilidade à TCH*
<i>M. tuberculosis</i>					
Classico	Positivo	Aeróbio	Sensível	Positivo	Resistente
Asiático	Positivo	Aeróbio	Sensível	Positivo	Sensível
<i>M. africanum</i>					
Tipo I	Negativo	Microaerófilico	Sensível	Positivo	Sensível
Tipo II	Positivo	Microaerófilico	Sensível	Positivo	Sensível
<i>M. bovis</i>					
Clássico	Negativo	Microaerófilico	Resistente	Negativo	Sensível
BCG**	Negativo	Aeróbio	Resistente	Negativo	Sensível

\* Estes testes não são aplicáveis a todas as estirpes de *M. bovis* porque algumas não crescem no meio usado.

\*\*O teste de confirmação para a BCG é a resistência à cicloserina (20 mg/l em meio sólido L-J).

Neste caso a identificação dos isolados foi feita através de PCR-REA (Polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis) (Niemann *et al.*, 2000) baseado na amplificação do gene *gyrB* e na hidrólise com as enzimas de restrição *RsaI*, *SacII* e *TaqI* (Duarte *et al.*, 2008).

A identificação de uma determinada espécie de *Mycobacterium* numa amostra tem uma especificidade absoluta (Vicente, 2004).

A análise genómica dos microorganismos é um procedimento complementar para a caracterização da espécie bacteriana e do seu biotipo (Martin e León, 1998). E onde estas técnicas de biologia molecular mostraram maior eficácia, foi precisamente na tipificação das estirpes de *Mycobacterium* (Tabela 12) (Duur *et al.*, 2000). Entre outros exemplos, Huard e colaboradores desenvolveram um método de tipificação baseado no PCR e nos locus cromossómicos que distinguem regiões diferenciadas, para diferenciar subespécies do MTC. Defendem a sua fiabilidade, rapidez, facilidade de execução e a sua utilidade para conseguir colecções de micobactérias, conferindo-lhe aplicações não só clínicas como epidemiológicas.

**Tabela 12** – Aplicações da genotipagem no âmbito da tuberculose animal (Fonte: Durr *et al.*, 2000; Haddad e Durand, 2001; Haddad *et al.*, 2004; Hewinson *et al.*, 2006; Duarte, 2008).

<b>Genotipagem</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinação da origem de um surto (nova estirpe ou estirpe de surto anterior);</li> <li>- Comparar isolados de diferentes espécies pertencentes à mesma área geográfica;</li> <li>- Pesquisar a presença de infecções mistas na mesma exploração;</li> <li>- Identificar os padrões dominantes em diferentes regiões geográficas ou países;</li> <li>- Estudar a evolução no tempo das estirpes e a sua movimentação entre países e/ou regiões;</li> <li>- Utilização em estudos filogenéticos;</li> <li>- Determinação de possíveis associações entre genotipo e patogenicidade e/ou virulência, explicando o sucesso e expansão geográfica de determinadas estirpes.</li> </ul>

O RFLP é especialmente aplicado na tuberculose humana porque *M. tuberculosis* possui maior número de cópias da sequência de inserção IS6110 no DNA genómico do que *M. bovis*. No entanto, em ambos se obtêm padrões com suficiente discriminação para serem aplicados na tipificação, o que justifica a aceitação internacional desta técnica (Vicente, 2004). A sequência IS 6110, apresenta número variável de cópias nas espécies do MTC, oscilando entre as 6 a 19 no *M. tuberculosis*, ainda que algumas estirpes tenham um número mais baixo de cópias (van Soolingen *et al.*, 1993). No caso de *M. bovis* encontraram-se até 13 cópias em bovinos e de 5 a 7 em caprinos (Liebana *et al.*, 1997).

Outra técnica utilizada na discriminação de membros do MTC é o spoligotyping (Vicente, 2004). Desde que Cousins (1998) publicou um protocolo de tipificação de estirpes de *M. bovis*, a técnica passou a ser utilizada com crescente interesse, ganhando terreno face ao RFLP por este necessitar de um cultivo prévio, maior quantidade de DNA, mais tempo e pessoal treinado (Goguet *et al.*, 1997). Apesar destas vantagens, possui também algumas desvantagens (Tabela 13), que podem ser minimizadas se esta técnica for empregue quando as estirpes são de áreas muito bem definidas, quando os perfis são infrequentes ou, ainda, quando acompanhada de outras técnicas (Barnes *et al.*, 2003).

**Tabela 13** – Principais vantagens e desvantagens do spoligotyping (Baseado em Goguet *et al.* (1997); Roring *et al.*, (2000); Barnes *et al.*, (2003)).

VANTAGENS	DESvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Específica para o MTC, permitindo a diferenciação entre as diversas estirpes que o constituem;</li> <li>- Requer pouco ADN. Permite a utilização directa a partir de amostras clínicas sem purificação do ADN.</li> <li>- Possibilidade de expressar os dados em formato digital, ideal para formar bases de dados de genotipos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Polimorfismo baseado na amplificação de um só locus;</li> <li>- Limitado poder de discriminação (podemos encontrar espoligotipos semelhantes em estirpes sem nenhuma relação epidemiológica).</li> <li>- Menor poder de discriminação entre estirpes de <i>M. tuberculosis</i> que o RFLP de IS6110.</li> </ul>

Aranaz e colaboradores (1996) compararam o spoligotyping e o RFLP com estirpes isoladas de bovinos, caprinos e animais selvagens. O spoligotyping demonstrou então grande utilidade para estudos epidemiológicos, sobretudo nas estirpes com apenas uma cópia de IS 6110. Consideraram-na, ainda, uma técnica muito adequada para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*. Pelo que recomendaram a tipificação inicial mediante spoligotyping, e posteriormente com RFLP de IS 6110, aplicado às estirpes incluídas nos espoligotipos mais comuns.

A coincidência de espoligotipos entre animais domésticos e selvagens, pode sugerir a transmissão de tuberculose entre elas. Apesar do reduzido número de estudos em Portugal, através desta técnica, já foram possíveis obter evidências moleculares que podem sugerir a transmissão de *M. bovis* entre javalis e bovinos e vice-versa (Duarte *et al.* 2007). A mesma equipa de investigadores também identificou os espoligotipos SB0265 e SB0157 a partir de caprinos em Portugal. Embora sem relação epidemiológica esses espoligotipos também foram encontrados em bovinos e animais selvagens.

A aplicação do *spoligotyping* nos estudos de tuberculose pode ser de grande utilidade apesar do seu poder discriminatório não ser óptimo (Zandem *et al.*, 2002). Para o melhorar estes autores introduziram 51 novos oligonucleótidos espaçadores, melhorando os resultados ao aumentar o número de padrões obtidos, recomendando a utilização desta membrana de *spoligotyping* de segunda geração para os casos que requerem maior discriminação, como por exemplo estirpes com baixo número de cópias de IS6110.

Duur e colaboradores (2000) apontam-na mesmo como técnica de eleição enquanto primeira abordagem na genotipagem de isolados de *M. bovis*.

Outra técnica molecular também utilizada com sucesso no âmbito da tuberculose, foi o PGRS (polymorphic GC-rich sequence), onde a capacidade de diferenciação de estirpes de *M. bovis* foi maior que no RFLP de IS 6110 e no *spoligotyping* (Costello *et al.*, 1999).

Uma das técnicas utilizadas, com resultados encorajadores em termos de discriminação na genotipagem de *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. caprae*, é a tipagem por MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersioned Repeative Units-Variable Number Tandem Repeats) (Sola *et al.*, 2003; Skuce *et al.*, 2005, Duarte *et al.*, 2010).

Trata-se de uma técnica baseada em PCR e assente no polimorfismo gerado pelo número de repetições em *loci* independentes do genoma (*tandem*). O polimorfismo de cada locus é variável e o número de *loci* estudados depende da espécie do MTC e se a finalidade do estudo é epidemiológica ou filogenética (Duarte, 2008). Duarte e colaboradores (2010), num estudo com isolados de *M. bovis* e *M. caprae*, consideram a tipificação por MIRU-VNTR melhor que a *spoligotyping* na identificação de explorações infectadas por multi-genotipos. Os mesmos autores confirmaram a transmissão de *M. bovis* entre bovinos e espécies silváticas pela utilização conjunta desta com a *spoligotyping*.

Os métodos moleculares permitiram a caracterização genética dos membros do MTC e juntamente com os métodos bioquímicos um conhecimento mais amplo das

características das diferentes espécies que afetam os caprinos e outros animais (Tabela 14).

Uma das principais limitações da utilização dos métodos moleculares, no âmbito da tuberculose, reside na grande semelhança genética entre os diferentes membros do MTC e no reduzido número de regiões cromossômicas exclusivas de cada espécie. Outra é que, lesões calcificadas, com muita fibrose e pequeno número de bacilos, inviabilizam muitas vezes a aplicação direta das técnicas moleculares a partir das amostras clínicas (Aranaz et al., 2006). Os testes moleculares são também dispendiosos, sobretudo os kits comerciais usados em muitos laboratórios. Por outro lado, vários estudos realizados sobre a utilidade de testes moleculares na detecção e amplificação de sequências específicas das espécies do MTC em amostras clínicas, revelaram uma menor sensibilidade do que a da cultura (Noredhoek et al., 2004; Cheng et al., 2005).

**Tabela 14** – Características bioquímicas e genéticas do *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. caprae* (Fonte: Niemann et al., 2002).

Característica	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. caprae</i> *
Morfologia das colónias	Eugónica	Disgónica	Disgónica
Acumulação de niacina	+	-	-
Redução de Nitratos	+	-	-
Sensibilidade à PZA**	sensível	resistente	sensível
Mudança de cor do meio de bromocresol	+	-	-
Crescimento no meio de Lebek	Aerofilico	Microaerofilico	Microaerofilico
Crescimento na presença de 1 µg TCH ml <sup>-1</sup>	+	-	-
Presença de <i>mp40</i>	+	-	-
Presença de mutação <i>oxyR</i> (G→A, posição 285)	-	+	+
Presença de mutação <i>gyrB</i> (G→A, posição 756)	-	+	+
Presença de mutação <i>pn<sub>c</sub>A</i> (G→A, posição 169)	-	+	-
Espoligotipos (Característica marcante)	Pelo menos um dos espaçadores 39-43 presente.	Espaçadores 39-43 ausentes.	Espaçadores 3-16 e 39-43 ausentes.

\* à data designado por genótipo caprino; \*\* teste realizado em BACTEC 460TB usando 100 µg de PZA ml<sup>-1</sup>

Assim, apesar dos enormes progressos da biologia molecular, o isolamento bacteriano é considerado ainda o método *gold standard* para o diagnóstico, sendo os métodos moleculares utilizados para a caracterização das estirpes isoladas em meio de cultura.

### 3.5. Intradermotuberculização simples

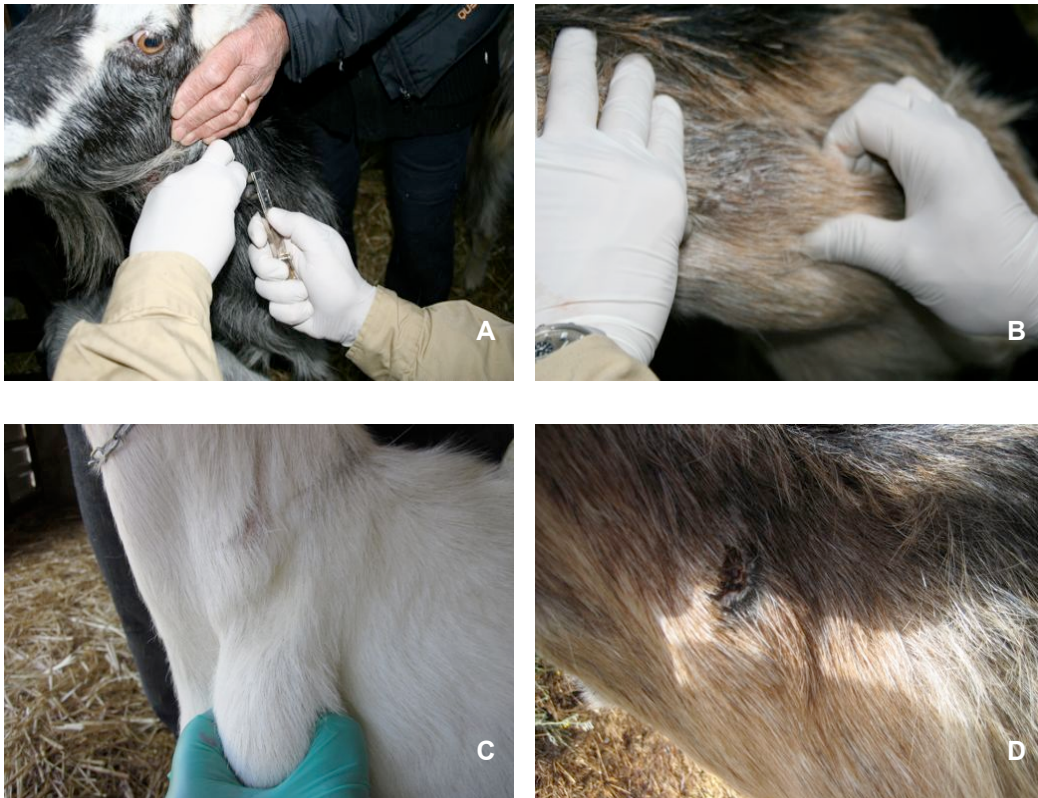
Tendo em conta o diagnóstico laboratorial e os aspectos clínicos e epidemiológicos descritos os serviços oficiais da Direcção Geral de Alimentação e Veterinária ordenaram a realização da prova de IDT simples a todos os animais com mais de um ano. A prova foi realizada pela OPP sob supervisão da DIV – Bragança (Divisão de Intervenção Veterinária) a 62 animais na exploração 1 e a 140 na exploração 2, com a inoculação na na tábua do pescoço de 0,1 ml por via intradérmica de 2000 UCT de PPD bovina - com seringas *McLighton* - (são indicados apenas o resultado de 58 e 133 animais respectivamente, porque foram excluídos do estudo todos os animais que morreram desde a IDT até ao abate incluindo o transporte para matadouro).

A interpretação dos resultados foi feita segundo os parâmetros estabelecidos pela OIE (“interpretação standard”), legislação comunitária e nacional, previstos no Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina (PNETB). A leitura foi realizada às 72 horas pós – inoculação, a espessura da pele foi medida com cutímetro com os seguintes resultados (Tabela 15).

**Tabela 15** – Resultados da IDT simples às 72 horas segundo critérios da OIE.

	<b>Exploração 1</b>	<b>Exploração 2</b>	<b>Total</b>
<i>Positivos</i>	86,2% (50/58)	93,2% (124/133)	<b>91,1%</b> <b>(174/191)</b>
<i>Duvidosos</i>	0,0% (0/58)	1,5% (2/133)	5,3% (7/133)
<i>Negativos</i>	13,8% (8/58)	<b>1,0%</b> <b>(2/191)</b>	<b>7,9%</b> <b>(15/191)</b>

A IDT e leitura foram realizadas pela mesma pessoa e destaca-se o facto de, nos animais positivos, em torno do local de inoculação se verificar uma reacção inflamatória intensa com espessamento da pele (“em placa”, não nodular) o que provocou incrementos muito consideráveis entre as duas medições (Figura 17).



**Figura 17** – Leitura dos resultados da IDT. (A) Medição com o cutímetro; (B) Espessamento da pele em “placa”; (C) Aumento do linfonodo pré-escapular; (D) Necrose pós – IDT.

Existem outros critérios, adaptados aos caprinos, sugeridos por diversos autores para interpretação da prova de IDT. Uns baseados, como o anterior, na medição do incremento da espessura da pele no ponto de inoculação, e outro, designado como “subjectivo” que consiste na palpação do local de inoculação, considerando como positivo qualquer aumento verificado (Garcia e Gutiérrez, 1996).

Este último foi sugerido na tuberculinização realizada na região cervical em caprinos (Sanson, 1988).

Relativamente a estudos que também consideraram a IDT simples, alguns autores consideraram como positivos aumentos superiores a 4 mm quando a inoculação era realizada na tábua do pescoço (Thorel, 1980) ou a 3 mm se a inoculação se realizava na região escapular (Garcia e Marquês, 1989). Mais recentemente, outros autores sugeriram novos critérios para interpretação da prova de IDT simples em caprinos (Tabela 16).

**Tabela 16-** Comparação de três critérios de interpretação da prova de IDT simples.

	<b>PNETB</b> ("interpretação standard")	<b>Garcia e Gutiérrez (1996)</b> ("interpretação rigorosa")	<b>Silva et al., (2006)</b>
<b>REACÇÃO NEGATIVA</b>	Se apenas se observar um inchaço limitado, com um aumento máximo de 2 mm de espessura da prega da pele, sem sinais clínicos, tais como edema difuso ou extenso, exsudado, necrose, dor ou reacção inflamatória dos canais linfáticos da região ou dos gânglios;	Aumento da espessura da pele inferior a 2 mm;	Aumento da espessura da pele menor ou igual a 1,7 mm;
<b>REACÇÃO DUVIDOSA</b>	Se não se observar nenhum dos sinais clínicos indicados anteriormente, mas o aumento de espessura da prega da pele for superior a 2 mm e inferior a 4 mm (isto é 3 mm);	_____	Aumento da espessura da pele entre 1,8 e 3,8 mm;
<b>REACÇÃO POSITIVA</b>	Se se observarem os sinais clínicos indicados anteriormente ou um aumento de espessura da prega da pele de 4 mm ou mais no sítio de injeção.	Aumento da espessura da pele superior a 2 ou mais milímetros.	Aumento da espessura da pele maior ou igual a 3,9 mm.

Os critérios sugeridos por Garcia e Gutiérrez (1996) ("interpretação rigorosa") são mais sensíveis sustentados no facto de serem direccionados para zonas de elevada prevalência de tuberculose caprina, ao contrário dos sugeridos pela legislação europeia aplicados aos bovinos em zonas de prevalência nula ou reduzida. Por sua vez, os critérios sugeridos por Silva *et al.*, (2006) foram obtidos a partir de caprinos sensibilizados experimentalmente e são similares aos valores encontrados por outros autores (Thorel e Gaumont, 1977; Liébana *et al.*, 1998).

Não se encontraram diferenças significativas entre a aplicação dos diferentes critérios à prova de IDT ( $P > 0,05$ ), o que pode ser justificado pelos aumentos consideráveis que se registaram nos animais considerados positivos, em média 11,51 mm, considerando as médias de 12,78 mm (4 – 22 mm) na exploração 1 e 11mm (1 – 29 mm) na exploração 2. Assim, a utilização de qualquer critério de interpretação não altera significativamente os resultados descritos, registando-se apenas diferenças pontuais (Tabela 17).

**Tabela 17** – Resultados da IDT simples às 72 horas comparando quatro critérios.

Critério	Exploração 1			Exploração 2			Total		
	Positivos	Duvidosos	Negativos	Positivos	Duvidosos	Negativos	Positivos	Duvidosos	Negativos
<b>PNETB</b>	86,21% 50/58	0% 0/58	13,79% 8/58	93,23 % 124/133	1,51% 2/133	5,26 % 7/133	91,1 % 174/191	1,05 % 2/191	7,85 % 15/191
<b>PNETB (sem sintomas)</b>	82,76% 48/58	3,45% 2/58	13,79% 8/58	88,72 % 118/133	3,76 % 5/133	7,52 % 10/133	86,91 % 166/191	3,67 % 7/191	9,42 % 18/191
<b>Silva et al., (2006)</b>	82,76% 48/58	3,45% 2/58	13,79% 8/58	88,72 % 118/133	4,51% 6/133	6,77% 9/133	86,91% 166/191	4,19 % 8/191	8,9 % 17/191
<b>Garcia e Gutiérrez (1996)</b>	86,21% 50/58	--	13,79% 8/58	93,23% 124/133	--	6,77 % 9/133	91,1% 174/191	--	8,9 % 17/191

Por exemplo na exploração 1, na comparação de resultados entre os critérios do PNETB e os propostos por Garcia e Gutiérrez (1996) ocorre apenas a transferência de 2 animais “duvidosos” para “positivos”, por este último não contemplar essa classificação. Os resultados de Silva *et al.*(2006) seriam idênticos aos do PNETB se não se aplicasse o critério da presença de sinais clínicos.

A existência de antígenos similares pertencentes a outras micobactérias ou a microorganismos do género *Nocardia* e *Corynebacterium* pode ocasionar reacções cruzadas e interferir com a especificidade da tuberculização (Lilenbaum, 2000). Assim, a IDT comparada, teste oficial aplicado nos bovinos, pode ser mais útil no diagnóstico da tuberculose caprina. Tal como para a IDT simples são sugeridos vários critérios de interpretação (Tabela 18).

**Tabela 18-** Comparação de três critérios de interpretação da prova de IDT comparada.

	<b>PNETB</b> (“interpretação standard”)	<b>Garcia e Gutiérrez (1996)</b> (“interpretação rigorosa”)	<b>Silva <i>et al.</i>, (2006)</b>
<b>REACÇÃO NEGATIVA</b>	Reacção bovina negativa ou reacção bovina positiva ou duvidosa mas igual ou inferior a uma reacção aviária positiva ou duvidosa e ausência de sinais clínicos nos dois casos;	Aumento da espessura da pele inferior a 2 mm; se reacção da PPD aviária superior considera-se positivo à paratuberculose.	Quando a resposta à tuberculina bovina for menor ou igual à aviária, ou ultrapassar a aviária até 1,8 mm;
<b>REACÇÃO DUVIDOSA</b>	Reacção bovina positiva ou duvidosa e superior em 1 a 4 mm à reacção aviária e ausência de sinais clínicos;	—————	Quando a reacção à tuberculina bovina for maior que à aviária com aumento entre 1,9 e 2,4;
<b>REACÇÃO POSITIVA</b>	Reacção bovina superior em mais de 4 mm à reacção aviária ou presença de sinais clínicos (isto é, maior ou igual a 5mm).	Aumento da espessura da pele no local de inoculação da PPD bovina superior 2 ou mais mm e sempre que a reacção a esta seja superior à da PPD aviária.	Quando a reacção bovina é superior á aviária em pelo menos 2,5 mm.

Com a aplicação dos critérios sugeridos por Garcia e Gutiérrez (1996) (“interpretação rigorosa”) em trabalhos de campo, detectaram-se caprinos com infecções mistas de tuberculose/ paratuberculose e com infecção única por tuberculose, enquanto que os caprinos infectados exclusivamente com paratuberculose foram considerados positivos à PPD aviária. Gutiérrez *et al.*, (1998) sugerem ainda como positivos todos os caprinos em que a resposta á tuberculina bovina supere a aviária em pelo menos 3 mm.

Underwood e Carfagnini (2005), compararam para esta prova os critérios da OIE com os de Garcia e Gutiérrez (1996) obtendo resultados bastante diferentes. Aplicando os critérios destes autores detectaram caprinos positivos à tuberculose e à paratuberculose, ao contrário do que aconteceu com a utilização dos critérios da OIE

onde não foram detectados animais positivos. Assim defendem a necessidade de se estabelecerem critérios apropriados para diagnóstico em caprinos.

As diferenças entre todas as interpretações descritas podem ocorrer devido a variações inerentes ao método, como o local de aplicação, a dose de tuberculina aplicada, o equipamento de leitura utilizado e até do próprio observador (Monaghan *et al.*, 1994). Por outro lado, os critérios oficiais elaborados para os bovinos são menos rigorosos que os sugeridos por vários autores para os caprinos, porque os bovinos apresentam reacções à tuberculinização mais intensas que os caprinos (Silva *et al.*, 2006).

Considerando os critérios do PNETB/OIE para interpretação dos resultados na IDT simples realizada, e admitindo como “doentes” os animais em que se encontraram lesões macroscópicas características com observação de BAAR e como “não doentes” aqueles onde elas não ocorriam, encontraram-se os seguintes resultados (Tabela 19):

**Tabela 19** – Sensibilidade relativa da IDT simples nos casos em estudo.

<b>Critério</b>	<b>Exploração 1</b>	<b>Exploração 2</b>	<b>Total</b>
“Doentes”	42	53	95
“Não doentes”	16	80	96
Verdadeiros Positivos (VP)	39	49	88
Verdadeiros Negativos (VN)	5	4	9
Falsos Positivos (FP)	11	75	86
Falsos Negativos (FN)	3	3	6
Duvidosos Positivos	-	1	1
Duvidosos Negativos	-	1	1
<b>SENSIBILIDADE</b>	<b>92,86 %</b>	<b>94,23%</b>	<b>93,62%</b>

Assim a título indicativo, a prova de IDT simples teve neste estudo uma sensibilidade relativa (93,62%) elevada.

A informação disponível sobre IDT simples em caprinos indica valores de sensibilidade entre 44,6% e 93,8% (tabela 20). Existem poucas estimativas de especificidade referidas na bibliografia apesar de um estudo recente apontar para valores superiores a 93%, ligeiramente menores que os da IDT comparada (Bezoz *et al.*, 2012).

**Tabela 20** – Valores de sensibilidade e especificidade à diferentes provas de diagnóstico da tuberculose caprina

Teste	Nº caprinos	Estado /Espécie envolvida	Sensibilidade	Especificidade	Observações	Referência bibliográfica
<b>IDT simples</b>	97	<i>M. bovis</i> (infecção natural)	93,8	87,5		García Marín (1993)
	87	<i>M. bovis</i> (infecção natural)	44,6/53,2	—	Interpretação standard/rigorosa	Liébana et al. (1998)
	131	<i>M. caprae</i> (infecção natural)	71	—	Interpretação rigorosa	Álvarez et al. (2008)
	24	<i>M. caprae</i> e <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (infecção natural)	54,2	—		
	45	<i>M. caprae</i> e <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (infecção natural)	88,8	—	Interpretação rigorosa	Bezós et al. (2009)
	45	<i>M. caprae</i> (infecção natural)	57,9/71,1	—	Interpretação standard/rigorosa	Bezós et al. (2011)
	937	Efectivos indenes de tuberculose	—	97,6-99,2/ 93-96	Interpretação standard/rigorosa (intervalos de confiança 95%)	Bezós et al. (2012b)
	49	<i>M. bovis</i> (infecção natural) ou <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (infecção natural)	83,7	—	Interpretação rigorosa	Gutiérrez et al. (1998)
	25	Caprinos negativos à cultura bacteriana	ND	100	Especificidade calculada usando animais com cultura bacteriana negativa (n = 12) de uma exploração positiva	
	131	<i>M. caprae</i> (infecção natural)	42,7	—	Interpretação rigorosa	Álvarez et al. (2008)
<b>IDT comparada</b>	24	<i>M. caprae</i> e <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (infecção natural)	29,2	—		
	45	<i>M. caprae</i> (infecção natural)	44,7/68,4	—	Interpretação standard/rigorosa	Bezós et al. (2011)
	937	Efectivos indenes de tuberculose	—	99,6-100/ 99,4-100	Interpretação standard/rigorosa (intervalos de confiança 95%)	Bezós et al. (2012b)

**Tabela 20** – Valores de sensibilidade e especificidade à diferentes provas de diagnóstico da tuberculose caprina

Teste	Nº caprinos	Estado /Especie envolvida	Sensibilidade	Especificidade	Observações	Referência bibliográfica
<b>IFN - <math>\gamma</math></b>	49	<i>M. bovis</i> (infecção natural) ou <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> (infecção natural)	83.7	—	PPD GZ Veterinária. Caprinos positivos se a OD PPD bovina for $\geq 1,5$ vezes a amostra não antigénica e $\geq$ avária PPD OD	Gutiérrez et al. (1998)
	25	Caprinos negativos à cultura bacteriana	—	96	Especificidade calculada usando animais com cultura bacteriana negativa	Garcia Marin (1993)
	ND	<i>M. bovis</i> (infecção natural)	91.6	100	Amostra sanguínea antes e 5–10 dias depois da IDT	
	48	<i>M. bovis</i> (infecção natural)	87.2	—	Caprinos positivos se a OD PPD bovina menos a da amostra não antigénica $\geq 0,05$ e a OD PPD bovina $>$ OD PPD avária	Liébana et al. (1998)
	131	<i>M. caprae</i> (infecção natural)	58/71	—	Interpretação standard/rigorosa	Álvarez et al. (2008)
	24	<i>M. caprae</i> / <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> (infecção natural)	58.3/66.7	—		
	45	<i>M. caprae</i> / <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> (infecção natural)	92.9	—	Interpretação rigorosa	Bezoz et al. (2009)
	35	<i>M. caprae</i> (infecção natural)	85.7/82.9	—	Interpretação standard/rigorosa	Bezoz et al. (2010b)
	45	<i>M. caprae</i> (infecção natural)	77,7/72,4	—	Utilizado o antígeno PPD/ cocktail ESAT-6 e CFP-10	Bezoz et al. (2011)
	937	Efectivos indenes de tuberculose	—	95,1-97,5/96,4-98,4	Caprinos positivos se a OD PPD bovina menos a da amostra não antigénica $\geq 0,05$ (ou 0,1) e a OD PPD bovina $>$ OD PPD avária	Bezoz et al. (2012b)
<b>ELISA</b>	44/51	<i>M. bovis</i> (infecção natural) ou <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> (infecção natural)	88.6/54.9	—	ELISA anamnestic/standard	Gutiérrez et al. (1998)
	25	Caprinos negativos à cultura bacteriana	—	95.8/88	Especificidade calculada usando animais com cultura bacteriana negativa	
	180	Positivos à IDT comparada	95	—	de uma exploração positiva	Shuraliev et al. (2012)
	31	Negativos à IDT comparada	—	100	<i>Enter Chemiluminiscent ELISA System</i> . Dados calculados com base nos animais positivos à IDT comparada	
	32	<i>M. bovis</i> (infecção natural)	95.6	—	MPB70 ELISA	Marassi et al. (2009)
	20	Exploração negativa durante 5 anos	—	100		

Os estudos realizados em caprinos à IDT comparada apresentam valores de sensibilidade muito dispare (tabela 20), mas especificidades muito elevadas (99,4-100%).

Em alguns estudos os valores elevados de sensibilidade e especificidade na IDT são semelhantes aos obtidos nos bovinos por vários autores (de la Rua *et al.*, 2006). No entanto, outros autores relatam sensibilidades baixas para a IDT (Liébana *et al.*, 1998; Bezos *et al.*, 2011). Assim, os resultados do teste de IDT variam em diferentes contextos consoante os autores, provavelmente devido a fatores genéticos e/ou ambientais que interferem com a imunoreactividade dos caprinos (Javed *et al.*, 2009) como a raça de caprinos, a estirpe envolvida e/ou o tempo de infecção. Ou seja, a tuberculose pode seguir diferentes padrões depois de ser introduzida num rebanho, desde surtos rápidos a surtos progressivos e cadenciais onde um menor nº de animais reage aos testes de diagnóstico (Bezos *et al.*, 2011).

Além do mais, Alvarez e colaboradores (2008) verificaram que a paratuberculose interfere com os resultados da IDT. Nos casos de infecção mista paratuberculose/tuberculose a IDT comparada apenas detectou 42,7% dos animais infectados. Mesmo com a aplicação dos critérios rigorosos Bezos e colaboradores (2011) apenas atingiram sensibilidades de 68,4%. Desse modo a IDT comparada não é adequada para o diagnóstico de tuberculose caprina em rebanhos com infecção mista com *M. avium subsp. paratuberculosis (Map)* dada a baixa sensibilidade nestas condições. Nesses casos a IDT simples é mais adequada. Por outro lado a IDT comparada é mais específica que a IDT simples o que a torna melhor em regiões com baixas prevalências de tuberculose caprina. (Bezos *et al.*, 2012a).

Quando a sensibilidade de uma prova é inferior a 100% inevitavelmente irão surgir falsos negativos (Sánchez *et al.*, 2008). As várias causas de falsos negativos à IDT estão resumidas nas tabela 21.

**Tabela 21 – Causas de falsos negativos à IDT em caprinos**  
(Monaghan *et al.*, 1994; Gutiérrez, 1996; Leppper *et al.*, 1997; Charleston *et al.*, 2001, Pollock e Neill, 2002; Vicente, 2004; Álvarez *et al.*, 2008)

<b>Causas de falsos negativos à IDT</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Animais com lesões muito exudativas e elevada carga bacteriana;</li><li>- Infecção inicial, aplicação da prova antes das 3 a 6 semanas pós – infecção;<ul style="list-style-type: none"><li>- Animais com infecção mista tuberculose/paratuberculose</li><li>- Animais vacinados para a paratuberculose;</li></ul></li><li>- Dessensibilização após várias tuberculinizações realizadas em intervalos breves de tempo;</li><li>- Factores imunossupressores (doenças intercorrentes, infecções víricas, pós-parto, má nutrição);<ul style="list-style-type: none"><li>- Administração ao animal de substâncias imunossupressoras (glucocorticoides);</li><li>- Anergia por esgotamento imunitário (tuberculose crónica e avançada);</li></ul></li><li>- Factores relacionados com a tuberculina usada (produto fora de validade, armazenamento inadequado, má administração, baixa potencia);<ul style="list-style-type: none"><li>- Leitura incorrecta da prova e aplicação de critérios errados.</li></ul></li></ul>

Na exploração 1, os 3 animais com resultado falso-negativo, apresentaram um espessamento cutâneo nulo sem reação ganglionar regional associada (gl. pré-escapular). Eram jovens adultos (17 meses), um tinha lesões de complexo primário pulmonar completo (CPP) e 2 de complexo primário pulmonar incompleto (CPPi). Tendo em conta a idade dos animais, o seu aparente bom estado de saúde e o quadro lesional encontrado, a não reatividade é provavelmente devida ao estágio inicial da infecção nesses animais. Os quadros de CPPi podem ter sido causados pela regressão das lesões pulmonares por ação do sistema imunitário de animais jovens saudáveis ou pela presença de lesões pulmonares muito pequenas e de difícil detecção macroscópica, que levaram a uma classificação errada. Na exploração 2 também se registaram 3 falsos-negativos, 2 animais (38 e 75 meses) com um espessamento cutâneo nulo sem reação ganglionar regional associada, e com um quadro de tuberculose generalizada à necropsia. A anergia por esgotamento imunitário pode justificar a falta de reação à prova. O terceiro animal de 35 meses apresentou um espessamento de 2 mm às 72 h mas sem reação ganglionar, tinha lesões de complexo primário pulmonar completo (CPP). A anergia, tipo de lesão (i.e. exsudativa), fatores imunossupressores/doença intercorrente (animal seropositivo à paratuberculose) podem justificar a fraca reação. De notar que segundo critérios mais exigentes defendidos por Garcia e Gutiérrez (1996) este animal seria considerado positivo.

Por sua vez, os falsos positivos surgem sempre que a especificidade da prova não é de 100% (Sánchez *et al.*, 2008). Entre outras causas (Tabela 22) destaca-se, tal como para os falsos negativos, o papel que a paratuberculose pode ter no surgimento de falsos positivos, quer pela infecção natural quer pela vacinação.

**Tabela 22** – Causas de falsos positivos à IDT em caprinos (Garcia e Gutiérrez, 1996 ; Pollock e Neill, 2002; de la Rúa *et al.*, 2006).

<b>Causas de falsos positivos à IDT</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reações inespecíficas de hipersensibilidade da pele;</li> <li>- Animais com infecção mista tuberculose/paratuberculose               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Animais vacinados para a paratuberculose;</li> </ul> </li> <li>- Vacinação experimental com a estirpe BCG do <i>M. bovis</i>;               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infecção por <i>M. avium</i> subespécie <i>avium</i>;</li> </ul> </li> <li>- Ingestão de micobactérias ambientais apatogénicas ou bactérias do género <i>Nocardia</i> ou <i>Corynebacterium</i>;               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inoculações com substâncias fraudulentas (ex. essência de trementina);</li> <li>- Intervalos entre tuberculinizações inferiores a 60 dias;</li> <li>- Incapacidade de encontrar lesões no exame post mortem;                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacilo em fase de latência.</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	

Neste último caso, pode surgir uma elevada percentagem de animais não infectados positivos à IDT simples. Na IDT comparada os resultados dependeriam do estado de infecção das duas doenças e dos critérios aplicados (Garcia e Gutiérrez,

1996), com alguns autores a salvaguardarem que a vacinação não interfere no diagnóstico em explorações indemnes de tuberculose caprina (Lorazo *et al.*, 2012)

Nos animais considerados como falsos positivos a média de reacção cutânea foi de 11,44 mm (12 mm na exploração 1 e 11,36 na exploração 2), ou seja, idêntica à dos considerados “positivos”. O elevado número de animais falsos positivos neste trabalho pode ser causado por vários factores. Em primeiro lugar, temos de considerar que, em fases muito precoces da infecção, os granulomas são muito pequenos e em pequeno número pelo que podem passar despercebidos ao exame de necrópsia, pelo que é necessária uma inspecção exaustiva para encontrar lesões iniciais ou pouco evidentes tal como sugerem alguns autores (Garcia e Gutiérrez, 1996b). Por outro lado a fase de latência da infecção pode ser a justificação para a ocorrência de alguns destes casos, nomeadamente em animais mais jovens e há menos tempo expostos à infecção. Finalmente, as reacções cutâneas provocadas por outros agentes que não *M. caprae* (ou *M. bovis*) podem ser responsáveis pelos falsos positivos, nomeadamente *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *M. avium* subs. *paratuberculosis* (Map). Nas necropsias realizadas não se encontraram lesões evidentes de pseudotuberculose nem foi possível identificar a presença de lesões de paratuberculose. Um trabalho apresentado recentemente relativo à região de onde são oriundas estas explorações refere valores de seroprevalência individual de Map em caprinos de 15,5% e 66,6% dos rebanhos de caprinos com pelo menos um animal seropositivo (Quintas *et al.*, 2012).

Na exploração 2 foi realizado a todos os animais tuberculinizados (n=140) o rastreio sorológico a Map através da utilização de um teste comercial ELISA (ID Screen®). Registaram-se 98 resultados negativos e um resultado nulo (por ausência de soro). A presença de anticorpos contra Map foi identificada em 41 animais (29,5% dos animais da exploração). De notar que 23 destes animais foram considerados “falsos-positivos” à IDT simples (ou seja, 30,67% dos falsos-positivos foram soropositivos a Map). E que se observaram 14 animais com infeção de tuberculose e concomitantemente soropositivos a Map. Estes resultados parecem evidenciar a importância que a paratuberculose pode ter tido no elevado número de falsos positivos registados neste estudo.

Á prova da tuberculina têm sido apontados vários inconvenientes, como o não proporcionar informação quanto ao grau de evolução da doença, a espera de 72 horas para se obter o resultado, as reacções cruzadas, os animais com curso crónico e avançado da tuberculose não apresentarem reacção (anergia). Além disso, como se tem constatado nas campanhas de erradicação, aumentam o número de animais

reactivos à tuberculina sem lesões aparentes à inspecção post-mortem (Acha e Szyfres, 2003; Vicente, 2004).

No que diz respeito à prova do IFN –  $\gamma$ , Liebana e colaboradores (1998) referem resultados de sensibilidade (87,2%) melhores que os encontrados no mesmo estudo para a IDT. Por sua vez, Gutiérrez e Garcia (1998) descrevem resultados de sensibilidade iguais ou superiores (entre 83,67% a 91,6%) e resultados de especificidade menores ou iguais (entre 96% a 100%) aos da IDT. Bezos e colaboradores (2010b) encontraram na prova do IFN –  $\gamma$  sensibilidades entre 77,1 % - 85,7% e entre 60% - 82,9 % consoante o critério aplicado (i.e. utilizando “cut-offs” de 0,05 e 0,1 respectivamente). A utilização de cocktail de antigénios ESAT 6/CFP 10 demonstrou valores de sensibilidade semelhantes aos da PPD bovina e superiores aos obtidos na IDT simples e comparada (Bezos *et al.*, 2011). Assim, a sensibilidade da prova do prova do IFN –  $\gamma$  em caprinos é maior ou idêntica à obtida com a IDT simples (Bezos *et al.*, 2010a) e maior que a da IDT comparada. A maior

Qualquer um dos resultados apresentados nesta prova é melhor do que os obtidos em rebanhos com infecção mista de tuberculose e paratuberculose (71%) (Alvarez *et al.*, 2008). Bezos e colaboradores (2010a) demonstraram que a presença de Map pode levar a diagnósticos errados, constatando a presença de muitos falsos negativos à prova devido à intensa resposta face à PPD aviária.

O teste do IFN- $\gamma$  nos caprinos apresenta valores semelhantes aos registados para a espécie bovina (Garcia e Gutiérrez, 1996). Este teste já foi empregue juntamente com a IDT com resultados satisfatórios (Vidal *et al.*, 1995, Alvarez *et al.*, 2008, Bezos *et al.*, 2009). As provas não se podem considerar complementares na detecção de animais com diferentes quadros lesionais, e o emprego em conjunto das duas apenas aumenta ligeiramente a sensibilidade do diagnóstico (Wood *et al.*, 1992).

O teste do IFN- $\gamma$ , tal como a IDT, tem como inconveniente o facto de não serem capazes de detectar animais infectados com deterioração da resposta imunitária de base celular (Charleston *et al.*, 2001; Hope *et al.*, 2005). A tabela 23 resume as vantagens e desvantagens do teste do IFN- $\gamma$  relativamente à IDT. De salientar a detecção mais precoce dos animais positivos: entre 1 a 5 semanas comparada com as 3 a 6 semanas necessárias para a IDT (Pollock *et al.*, 2005). O não necessitar de um período de dessensibilização, uma vez que ao não ser inoculada tuberculina, não há interferência com o sistema imunitário do hospedeiro (de la Rua *et al.*, 2006). No entanto, as tuberculinizações recentes modificam os resultados da prova, logo, se se realizou uma IDT recentemente, deve esperar-se pelo menos 60 dias para a realização do teste do IFN- $\gamma$ . Outra vantagem importante é a capacidade que esta prova tem de diferenciar a resposta do IFN- $\gamma$  em animais infectados com *M.*

*bovis* e *M. tuberculosis* da resposta produzida pela infecção por micobactérias ambientais ou pela vacinação com o *M. bovis* – BCG. Para tal utilizam-se durante a realização da prova antígenos diferentes da PPD bovina, como por exemplo, o ESAT 6 e a CFP 10 (Pollock *et al.*, 2003; Buddle *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2004; Bezos *et al.*, 2011). Por outro lado, o grau de interferência da vacinação contra a paratuberculose nesta prova pode ser totalmente mitigado com a utilização reagentes DIVA - *differentiation of infected and vaccinated animals reagents* (Pérez de Val *et al.*, 2012).

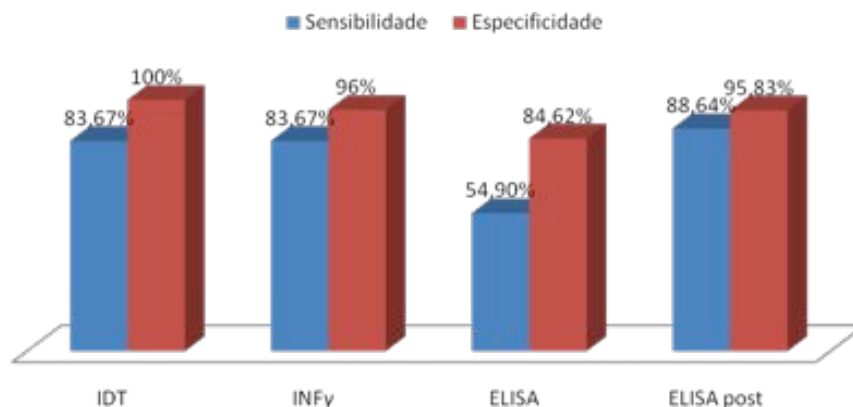
**Tabela 23** – Vantagens e desvantagens do teste do IFN- $\gamma$  face à IDT (Fonte: Garcia e Gutiérrez, 1996; de la Rua *et al.*, 2006).

VANTAGENS	DESvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilidade semelhante à IDT simples e maior que a da IDT comparada;</li> <li>- Detecta animais positivos antes da IDT;</li> <li>- Possibilidade de repetição sem período de espera;</li> <li>- Não é necessária uma segunda visita à exploração para fazer a leitura;</li> <li>- Mais objectiva e os resultados são mais fáceis de standardizar;</li> <li>- Reduz as manipulações fraudulentas;</li> <li>- Capacidade de distinção entre respostas às micobactérias patogénicas e às ambientais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maiores custos;</li> <li>- Necessidade de armazenar o sangue em condições de refrigeração e de o transportar rapidamente para laboratório (o sangue tem de ser processado em menos de 8 horas após a colheita, o que exige uma grande coordenação entre o campo e o laboratório);</li> <li>- Tuberculinizações recentes modificam os resultados da prova (esperam-se pelo menos 60 dias depois da IDT para realizar a prova).</li> </ul>

Em efetivos caprinos indemnes de tuberculose a prova do IFN –  $\gamma$  demonstrou valores de especificidade elevados (98,4%) (Bezos *et al.*, 2012b). No entanto, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que possui antígenos da parede celular semelhantes aos de *Mycobacterium spp.*, e a vacinação contra a paratuberculose podem causar o aparecimento de falsos positivos não só à IDT mas também à prova do IFN –  $\gamma$  (Sharpe *et al.*, 2010, Bezos *et al.*, 2012b). No entanto o efeito de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na sensibilidade e especificidade destas provas ainda está por avaliar. Em caso de linfadenite caseosa (e ausência de tuberculose) a prova de eleição é a IDT comparada.

Em todo o caso a sensibilidade dos testes serológicos atuais para diagnóstico da tuberculose caprina é menor que os dos testes baseados a imunidade mediada por células (Bezos *et al.*, 2012a).

Os resultados da prova de ELISA realizados 15 a 20 dias depois da tuberculinização (ELISA anamnésica) alcançam uma sensibilidade (88,64%) e especificidade (95,83%) maiores que o teste normal de ELISA (54,9% de sensibilidade e 84,62% de especificidade). Obtêm-se assim resultados iguais ou superiores aos registados em outras provas (Figura 18) (Gutiérrez e Garcia, 1998):



**Figura 18** – Valores de sensibilidade e especificidade de diversas provas diagnósticas aplicadas ao diagnóstico da tuberculose caprina (Fonte: Garcia e Gutiérrez, 1996)

A recente prova de ELISA (*Enfer Chemiluminescent Multiplex ELISA System*) pode atingir uma sensibilidade elevada (95%) e uma especificidade absoluta (Shuralev *et al.*, 2012) mas são necessários mais estudos que sustentem estes dados.

A combinação entre diferentes métodos pode melhorar os resultados em termos de diagnóstico. A realização de IDT simples em conjunto com o teste do IFN- $\gamma$  garante grandes sensibilidades, 95,8% (Liebana *et al.*, 1998) e 90,8% (Alvarez *et al.*, 2008) e também grande especificidade (96%) (Liebana *et al.*, 1998). Quando a IDT comparada é combinada com a prova do IFN -  $\gamma$  a sensibilidade decresce para 82,4% (Gutiérrez *et al.*, 1998). A utilização dos critérios rigorosos para a IDT simples e para a prova do IFN -  $\gamma$  aumenta a sensibilidade das provas (88,8% e 92,9% respectivamente) (Bezoz *et al.*, 2009).

Por sua vez, a sensibilidade da ELISA anamnésico para detectar tuberculose em cabras com lesões graves demonstra uma excelente complementaridade com a IDT, permitindo a detecção de animais anérgicos a esta prova. Esses animais têm um alto nível de anticorpos circulantes, e uma vez detectados, podem ser eliminados do rebanho já que constituem um grande risco, por serem grandes eliminadores de bacilos para o meio (Rittaco *et al.* 1990; Garcia e Gutiérrez, 1996a). Assim vários autores sugerem que uma combinação da IDT e da ELISA anamnésico pode produzir vantagens substanciais em campanhas de erradicação, tanto mais que se trata de uma prova simples e de baixo custo (Garcia e Gutiérrez, 1996b; Vicente, 2004; Sánchez *et al.*, 2008). Esta combinação é aconselhada nos casos de infecção persistente, em surtos repentinos e em rebanhos onde se pretenda reduzir o mais

rapidamente possível os níveis de infecção independentemente dos custos. No entanto, a prova de ELISA demonstra maior utilidade nos primeiro e segundo controlos, após os quais, dado os curtos intervalos entre IDT, perde o interesse (Léon, 1996).

Tendo em conta a escassez de estudos existentes relativamente às provas que são utilizadas no diagnóstico da tuberculose caprina, a necessidade de mais investigação nesta área é evidente, pois é fundamental obter mais informação relativamente à sensibilidade e sobretudo à especificidade dos vários testes.

### 3.6. Exame pós morte

Considerando os animais que foram abatidos (n=271, tabela 24) e o número de animais onde foram identificadas lesões características de tuberculose, podemos referir uma prevalência de 95 animais adultos com lesões (49,74%) e de 26 animais jovens com lesões (32,5%). A prevalência global foi de 121 caprinos com lesões (44,65%). De notar que, dado o número de falsos positivos que foram considerados, a IDT simples apontava para uma prevalência muito maior, de 174 animais adultos com tuberculose (91,1%).

Ocorreram diferenças significativas entre os grupos considerados ( $P < 0,05$ ) sendo mais frequente o aparecimento de lesões típicas de tuberculose nos animais adultos (Tabela 24).

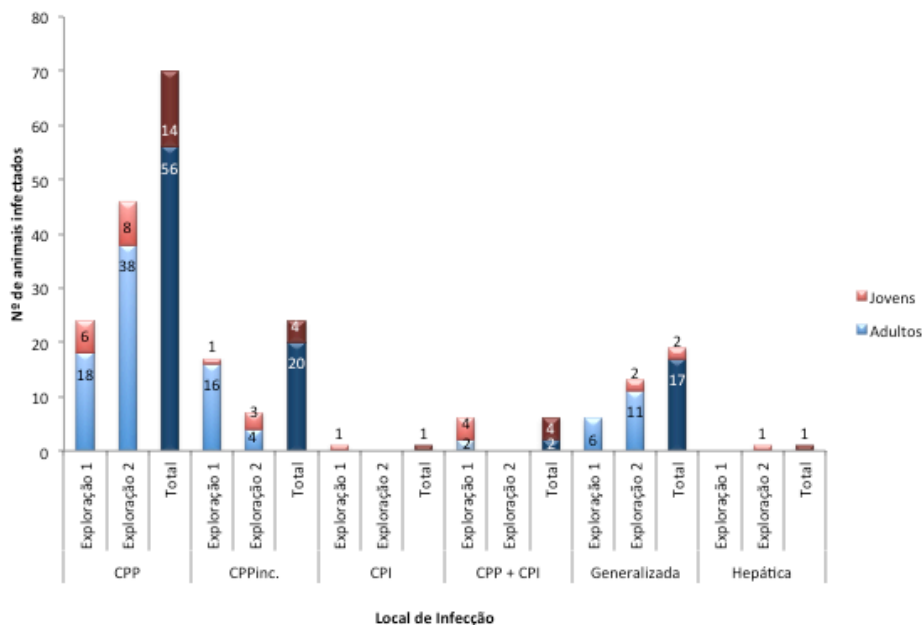
**Tabela 24** – Prevalência de quadros lesionais de tuberculose ao abate.

	Exploração 1	Exploração 2	Total
<b>Nº animais abatidos</b>	<b>83</b>	<b>188</b>	<b>271</b>
<b>Lesões típicas à necropsia Caprinos &gt; 1 ano</b>	72,41% (42/58)	39,85% (53/133)	49,74% (95/191)
<b>Lesões típicas à necropsia Caprinos &lt; 1 ano</b>	48% (12/25)	25,45% (14/55)	32,5% (26/80)
<b>Lesões típicas à necropsia (Todos)</b>	65,06% (54/83)	35,64% (67/188)	44,65% (121/271)

a≠b, para  $P \leq 0,05$  (entre linhas, mesma coluna)

Durante os procedimentos de necropsia avaliaram-se sistematicamente a presença de lesões nos seguintes órgãos: pulmão, gânglios linfáticos mediastínicos, gânglios linfáticos mesentéricos, fígado, baço e glândula mamária, registando-se ainda toda a restante informação relevante.

No exame macroscópico dos animais afectados observaram-se diferentes quadros (Figura 19): complexo primário pulmonar completo (CPP) ou incompleto (CPPinc.), e/ou digestivo (CPI) e tuberculose generalizada.



**Figura 19** - Quadros lesionais de tuberculose encontrados à necropsia.

Tal como foi referido na revisão bibliográfica, a localização do complexo primário sugere a via provável de infecção. Assim e tendo ainda em atenção a localização dos CP nos casos de tuberculose generalizada, nos animais adultos, a contaminação por via aerógena terá ocorrido em 81 caprinos (85,6%), por via digestiva em 1 caprino (1,1%) e simultaneamente pelas duas vias em 13 caprinos (13,7%) ( $P \leq 0,001$ ). Por seu lado, nos jovens a contaminação por via aerógena ocorreu em 18 caprinos (69,2%), por via digestiva em 1 caprino (3,9%) e por ambas em 6 caprinos (23,1%) ( $P \leq 0,001$ ). Num animal recém-nascido (3,9%) encontraram-se lesões de tuberculose exclusivamente hepática o que sugere a infecção congénito-hepática (até aqui ainda não descrita na tuberculose caprina). Desse modo, pode indicar-se como forma mais provável de infecção a via aerógena, que ocorreu, de forma exclusiva, em 81,8% dos casos.

Nas lesões de complexo primário observaram-se lesões caseocalcárias únicas nos pulmões e gânglios linfáticos brônquicos e no complexo primário digestivo lesões semelhantes nos gânglios linfáticos mesentéricos e mais discretas no intestino (Figura 20).



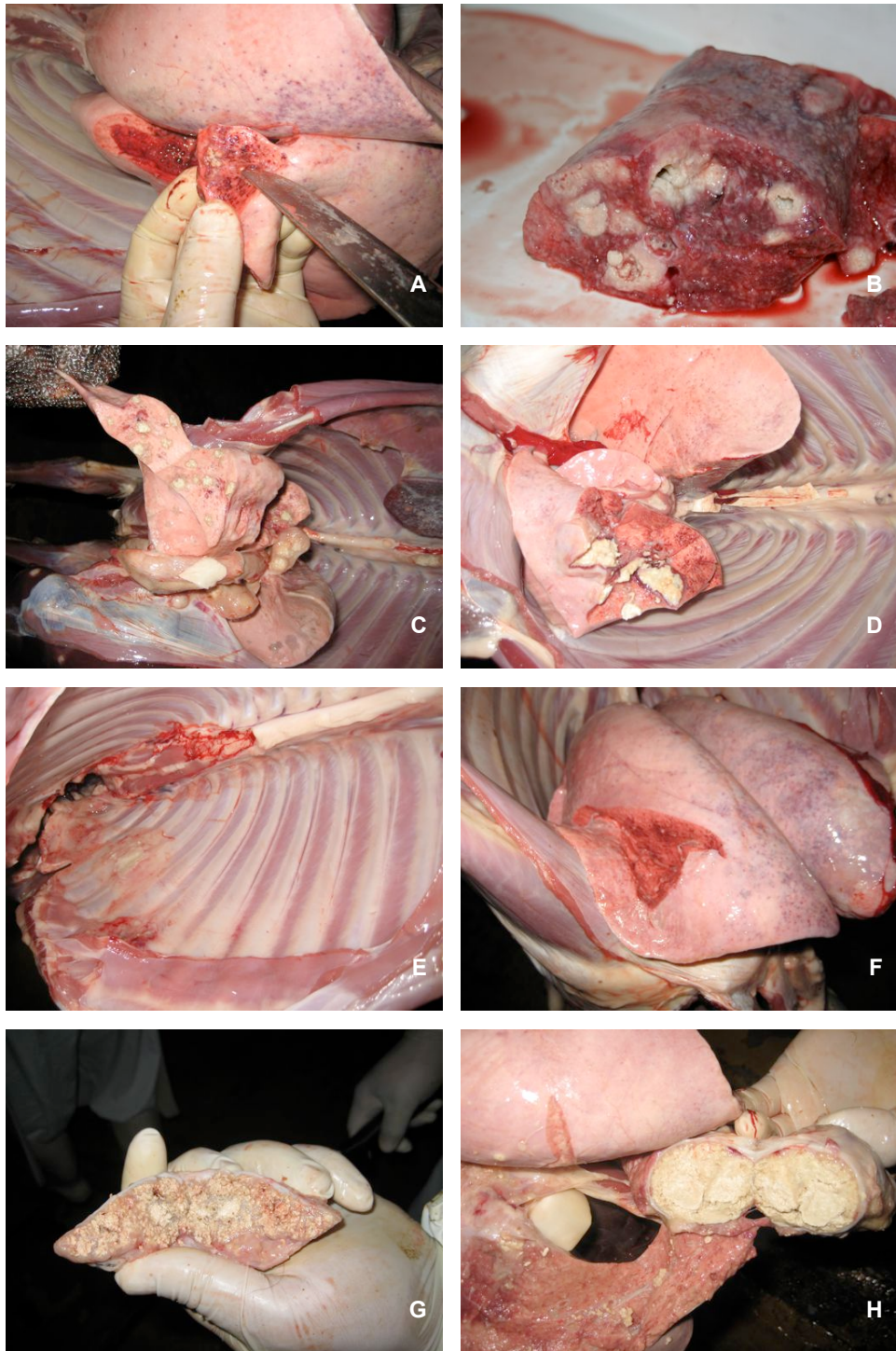
**Figura 20** – Lesões de complexo primário intestinal: intestino (A) e gânglio linfático mesentérico (B).

Nos casos de generalização, para além dos pulmões e gânglios linfáticos, os órgãos geralmente afectados foram o fígado, o baço, os gânglios mesentéricos e a glândula mamária. Ocorram, ainda, casos de tuberculose perlácea das serosas, observando-se lesões caseosas, arredondadas, de diferentes tamanhos aderentes às serosas (figura 21).



**Figura 21** – Tuberculose perlácea das serosas.

Nos pulmões as lesões de complexo primário eram únicas, elevadas, de pequenas dimensões, (0,1 a 2 cm de diâmetro), aparentemente capsuladas, de coloração branco amarelada, com necrose de caseificação e calcificação. Estas lesões apresentavam bordos irregulares e foram observadas na superfície pleural, continuando-se em profundidade (figura 22-A).



**Figura 22** – Quadros lesionais de tuberculose pulmonar caprina (A, B, C, D, E e F) e linfadenite granulomatosa: lesões caseo-calcárias nos gânglios mediastínicos (G e H).

Este órgão encontrava-se ainda afetado em animais com quadro de generalização, com lesões que variavam de focos caseocalcários, miliares (figura 22-F), a áreas mais extensas, com mais de 4 cm de diâmetro, não capsuladas, de contornos mal definidos, onde predominou a caseificação por vezes com aspecto branco-amarelado, pastoso (“amolecimento do caseo”) e constituindo cavernas com centro vazio, com distribuição multifocal (figura 22-B,C e D). Por vezes, as lesões estiveram associadas a áreas de espessamento da pleura, aderências pleurais (figura 22-E), hemorragias petéquiiais e lesões próprias de pneumonia intersticial com afecção das áreas ventrodorsais, visualizando-se áreas correspondentes à impressão das costelas na superfície pleural (figura 22-F).

Os gânglios linfáticos, nos casos de complexo primário, apresentavam lesões únicas ou múltiplas, com distribuição multifocal, de aspecto caseoso, apresentando, ao corte, áreas endurecidas de calcificação. Nos casos de generalização, as lesões foram mais extensas, por vezes com ausência de calcificação, chegando a afectar o gânglio na sua totalidade, de forma multifocal ou generalizada (figura 22-G e H).

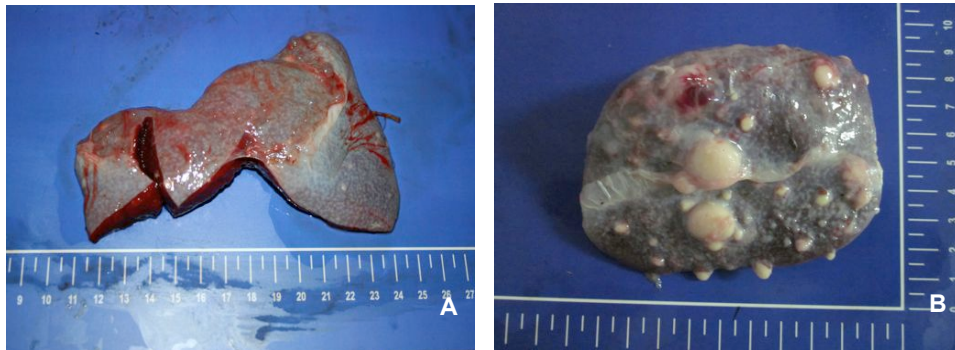
O fígado estava afectado em animais com generalização do processo, exibindo na maioria dos casos focos miliares, elevados, com localização sub-capsular, aparentemente revestidos por cápsula fibrosa, com cerca de 1-2 cm de diâmetro (figura 23-A).



**Figura 23** – Tuberculose miliar (A) e de grandes nódulos (B) no fígado.

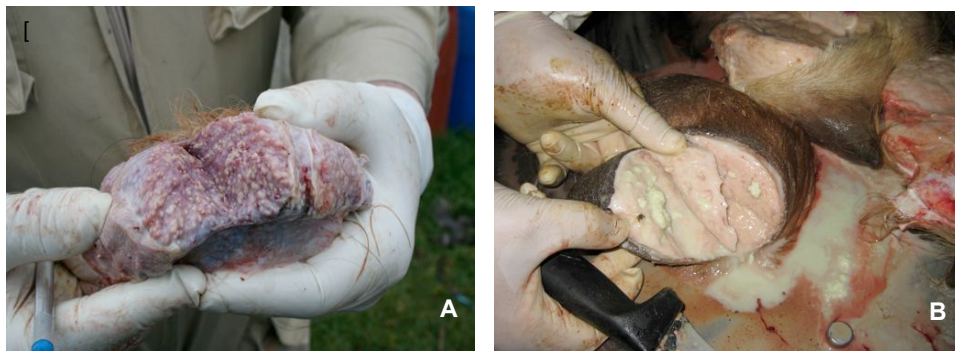
A localização dos complexos primários sugere que a generalização precoce do processo ocorre para este órgão a partir da tuberculose com origem pulmonar e/ou intestinal. Em alguns animais, com complexo primário pulmonar encontrou-se uma outra forma de generalização precoce, a tuberculose de grandes nódulos, observando-se lesões salientes, de maiores dimensões (6 a 9 cm de diâmetro: figura 23-B) com localização sub-capsular.

No baço também se encontraram lesões nos casos de tuberculose generalizada. Observaram-se lesões granulomatosas miliares no parênquima esplênico e na maioria dos casos nódulos proeminentes na superfície esplênica, semelhante à de grandes nódulos hepática, mas de menor diâmetro (3 cm) e de coloração branca amarelada (Figura 24).



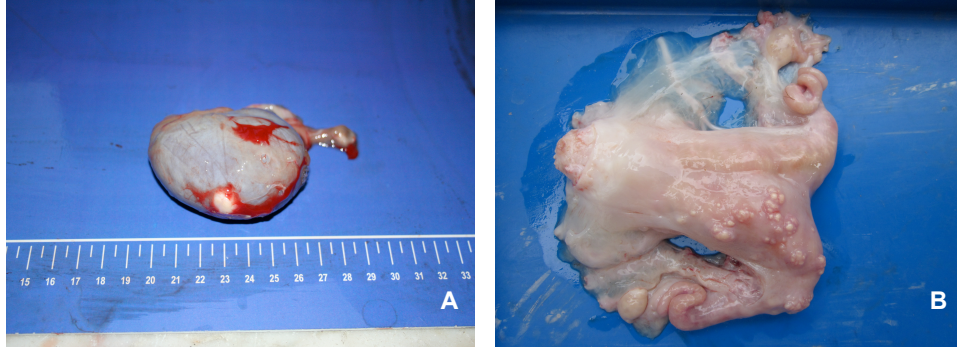
**Figura 24** – Tuberculose esplênica: (A) Miliar: (B) e de grandes nódulos.

A glândula mamária (figura 25) apresentou lesões em 6 animais (3 em cada exploração), correspondente a 6,32% dos casos de tuberculose em adultos. Esta percentagem é muito superior á menor de 1% descrita por outros autores (Garcia e Gutiérrez, 1996a), o que realça a importância desta via como possível via de transmissão zoonótica nestes focos e pode ser a justificação para a transmissão digestiva sugerida em alguns animais jovens. Num dos casos, observaram-se múltiplos focos granulomatosos distribuídos pela glândula mamária com consistência de “areia” ao corte. Nos outros casos, apresentavam lesões de cor amarelo pálido e consistência pastosa, multifocais, com dimensões que variam entre 2 e 5 cm.



**Figura 25** – Quadros lesionais de tuberculose mamária.

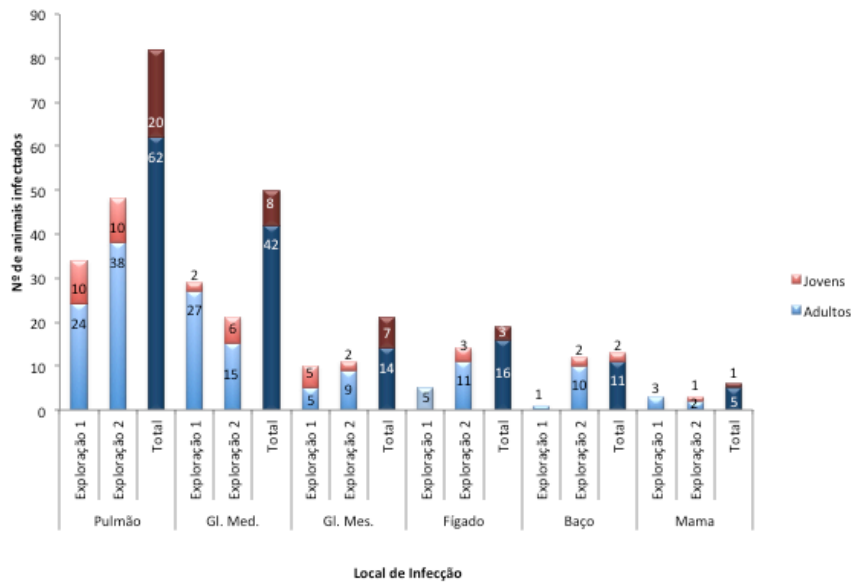
Em alguns casos de tuberculose generalizada também foram encontradas lesões granulomatosas proeminentes focais e multifocais no rim, no útero e nos ovários (Figura 26).



**Figura 26** – Quadros lesionais de tuberculose: (A) no rim; e (B) no útero e ovários.

Os órgãos que apresentaram lesões no exame macroscópico foram colhidos e fixados em formol para posterior exame histopatológico.

O resumo do número de lesões características de tuberculose observadas em cada órgão está registado na figura 27.



**Figura 27**- Distribuição das lesões de tuberculose nos órgãos dos caprinos necropsiados.

À semelhança do que se fez para a taxa de mortalidade, para analisar a presença de lesões características por escalão etário a população foi dividida em 6 grupos etários. A presença de lesões variou em função da exploração ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 25).

**Tabela 25** - Animais com lesões de tuberculose por escalão etário.

Idade (meses)	Exploração 1	Exploração 2	Total
0 – 17	52,5% <sup>a</sup> (21/40)	25,9% <sup>a</sup> (21/81)	34,7% <sup>a</sup> (42/121)
18 – 30	88,9% <sup>b</sup> (8/9)	0,0% <sup>b</sup> (0/2)	72,7% <sup>b</sup> (8/11)
31 – 43	87,5% <sup>b</sup> (7/8)	42,9% <sup>c</sup> (6/14)	59,1% <sup>c</sup> (13/22)
44 – 56	70,0% <sup>c</sup> (7/10)	44,7% <sup>c</sup> (17/38)	50,0% <sup>c,d</sup> (24/48)
57 – 69	100,0% <sup>d</sup> (3/3)	48,7% <sup>c</sup> (19/39)	52,4% <sup>c</sup> (22/42)
> 70	61,5% <sup>a,c</sup> (8/13)	28,6% <sup>a</sup> (4/14)	44,4% <sup>a,d</sup> (12/27)
<b>Efetivo</b>	<b>65,1%<sup>x</sup></b> <b>(54/83)</b>	<b>35,6%<sup>y</sup></b> <b>(67/188)</b>	<b>44,7%<sup>y</sup></b> <b>(121/271)</b>

a≠b, a≠c, a≠d, para  $P \leq 0,05$  (entre linhas, mesma coluna)

b≠c, b≠d, para  $P \leq 0,05$  (entre linhas, mesma coluna)

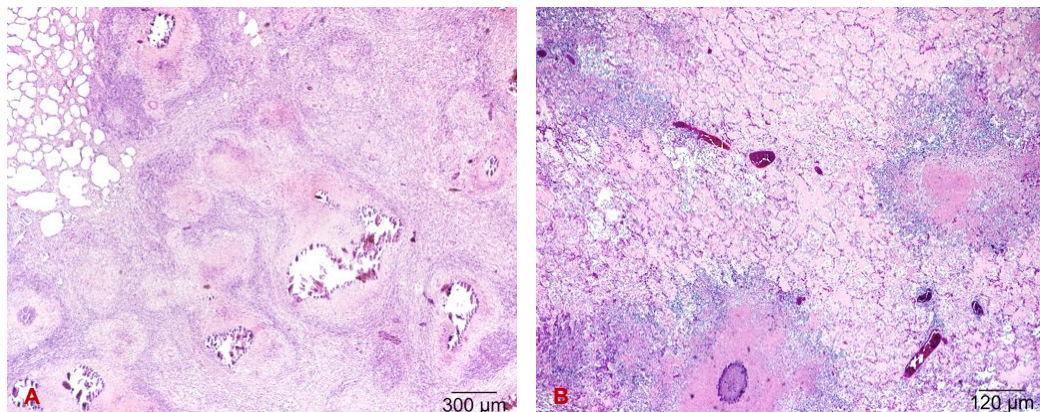
c≠d, para  $P \leq 0,05$  (entre linhas, mesma coluna)

x≠y, para  $P \leq 0,05$  (entre colunas).

Apesar de se registarem diferenças significativas entre alguns grupos etários ( $P \leq 0,05$ ) não há um padrão evidente de aparecimento de lesões por idade. Destaca-se no entanto o facto de aparecerem lesões em todos os grupos incluindo os animais mais jovens. Mais uma vez pensamos que as diferenças entre explorações se devem ao facto de na exploração 1 a doença ter entrado “*de novo*” o que justifica a maior quantidade de casos com a presença de quadros lesionais.

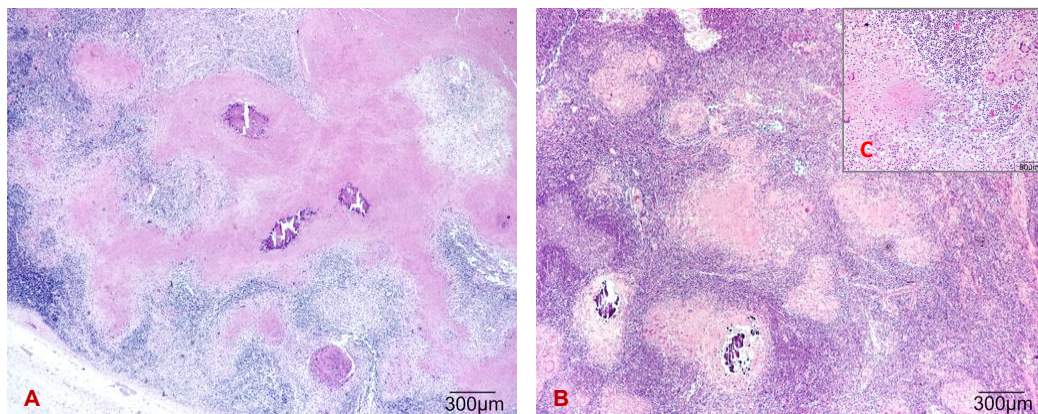
### 3.7. Exame histopatológico

Os pulmões apresentavam lesões de pneumonia granulomatosa, com granulomas de diferentes características histológicas. Em alguns animais, observaram-se um ou mais granulomas pulmonares com necrose de caseificação e calcificação distrófica central, rodeada por macrófagos, células epitelióides, linfócitos, plasmócitos e células gigantes de tipo Langhans (Figura 28). Em alguns casos, os granulomas estavam rodeados total ou parcialmente por cápsula fibrosa que os individualizava do parênquima pulmonar, que se encontrava com normal estrutura e organização histológica ou com espessamento dos septos interalveolares e presença de estruturas parasitárias (pneumonia parasitária). Um dos animais (que no exame ante morte apresentava sinais de lesão neurológica) apresentava lesões próprias de pneumonia intersticial crônica com hiperplasia do tecido linfóide e da musculatura lisa (imagem sugestiva de CAEV). Em outros animais, os granulomas apresentavam escassa necrose de caseificação ou mesmo ausência da mesma, com predomínio de células idênticas às descritas.



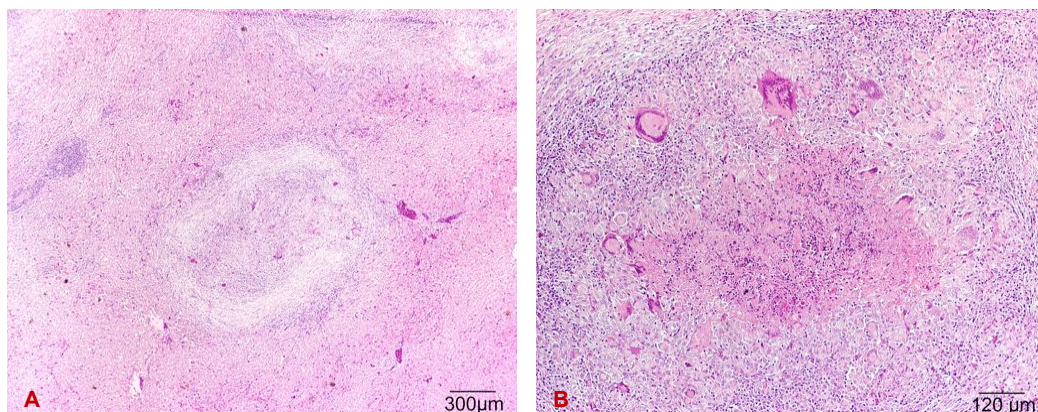
**Figura 28** – **A:** Pneumonia granulomatosa compatível com tuberculose (H&E). **B:** Pneumonia granulomatosa com predomínio de lesões exsudativas (H&E).

As lesões ganglionares incluíram granulomas de diferentes tamanhos, uns maiores, com predomínio de necrose de caseificação e calcificação central, sem cápsula evidente e outros mais pequenos, com características diferentes, sem necrose de caseificação ou com necrose de caseificação escassa e grande quantidade de células inflamatórias envolventes (Figura 29). Os primeiros observaram-se nos animais com tuberculose generalizada, e os segundos constituíram lesões de complexo primário respiratório ou digestivo



**Figura 29 – A:** Linfadenite granulomatosa compatível com tuberculose nos linfonodos brônquicos. De notar múltiplas lesões granulomatosas coalescentes (H&E). **B:** Linfadenite granulomatosa no linfonodo mesentérico. Observam-se múltiplos granulomas com diferentes características, uns com escassa necrose de caseificação e outros com necrose de caseificação e calcificação central (H-E). **C:** Pormenor da imagem anterior (H&E).

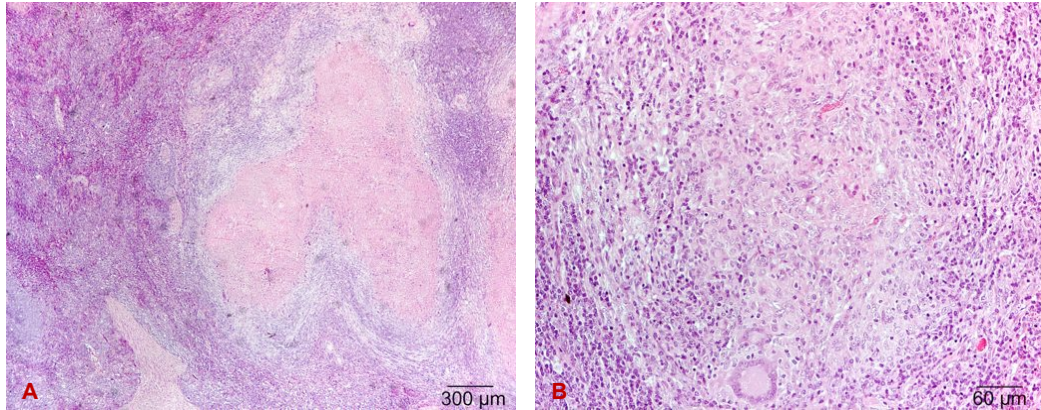
No fígado a imagem predominante foi de uma hepatite granulomatosa multifocal com granulomas multifocais a coalescentes com encapsulamento incompleto cujo centro constituía amplas áreas de necrose de caseificação, que ocupavam a maior área e algumas células inflamatórias envolventes, como macrófagos, linfócitos e células epitelióides, com abundantes células gigantes de Langhans. Na região periportal observa-se uma infiltração inflamatória por macrófagos e linfócitos (Figura 30).



**Figura 30 – A e B:** Hepatite granulomatosa compatível com tuberculose (H&E).

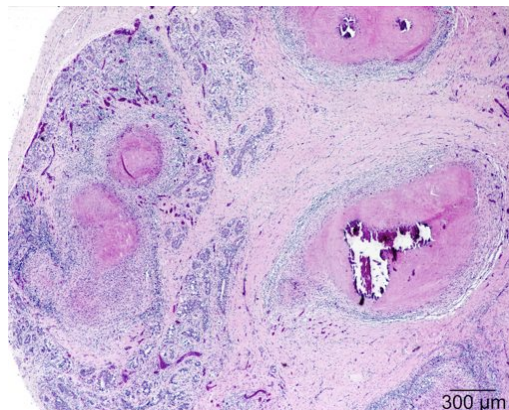
No baço observaram-se múltiplos granulomas coalescentes, geralmente capsulados, com necrose de caseificação e escassa infiltração celular envolvente. Em

algumas áreas os granulomas apresentavam necrose de caseificação escassa ou ausente com reacção celular abundante, incluindo células gigantes de tipo Langhans (Figura 31).

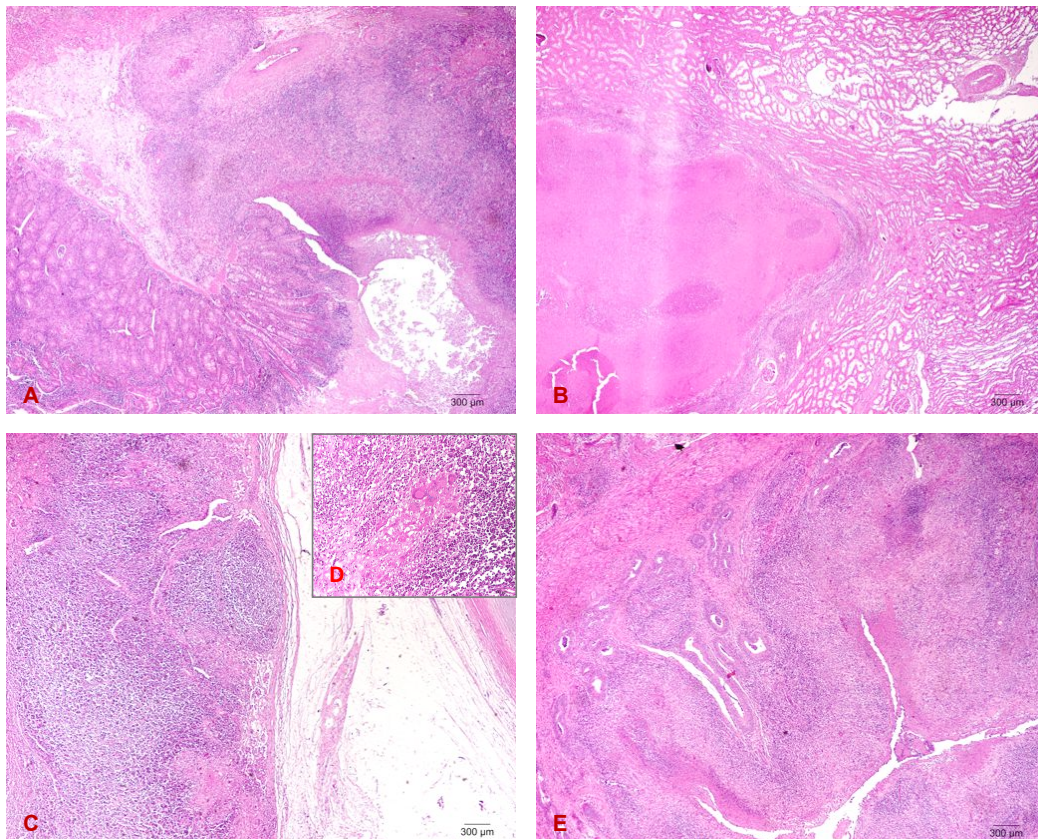


**Figura 31**– **A:** Esplenite granulomatosa (H&E). **B:** Granulomas esplénicos sem necrose de caseificação e abundantes células epitelióides e células gigantes de Langhans (H&E).

Na mama observaram-se múltiplos granulomas, por vezes coalescentes, não capsulados, com extensa necrose de caseificação (figura 32).



**Figura 32** – Mamite granulomatosa. De notar múltiplos granulomas, alguns dos quais rodeados por cápsula de tecido conjuntivo (H&E).

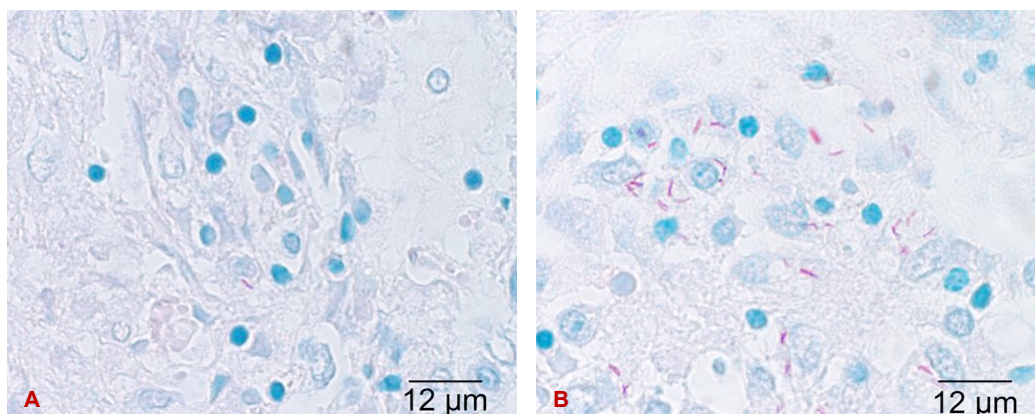


**Figura 33** – **A:** Enterite granulomatosa ; **B:** Nefrite granulomatosa; **C e D:** Traqueíte granulomatosa ; **E:** Metrite granulomatosa.

Também foram observadas lesões em outros órgãos (ex. intestino, rim, traqueia e útero) mas de forma mais esporádica que os órgãos já descritos. Nos cortes observados foi possível observar inflamações granulomatosas multifocais com áreas de necrose de caseificação envolvidas por macrófagos, linfócitos, células epitelioides e células gigantes de Langhans (Figura 33).

O quadro lesional descrito é coincidente com o encontrado por outros autores.

Nos animais com complexo primário e em alguns casos de generalização observaram-se, na coloração Ziehl-Nielsen, escassos bacilos álcool-ácido resistentes no citoplasma de células epitelióides ou macrófagos (Figura 34-A). Em outros casos de tuberculose generalizada, especialmente nos casos em que a caseificação era mais evidente, a quantidade de bacilos observada era maior (Figura 34-B).



**Figura 34** – Bacilos álcool-ácido resistentes (Ziehl-Neelsen (ZN)).

A coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) trata-se de uma técnica classicamente considerada de elevada sensibilidade, embora não seja específica para o *M. bovis* (Garcia e Gutiérrez, 1996b) ou *M. caprae* nem para as micobactérias, pois também cora bactérias do género *Nocardia* e *Schistosoma* (Ulrichs *et al.*, 2005). Também, Ulrichs e colaboradores (2005) não a consideram suficientemente sensível, referindo que muitas amostras positivas em cultura e no PCR são negativas ao ZN. Outro inconveniente reside no facto de se basear na retenção de corantes pela parede das micobactérias, e assim não corar aquelas que não possuam ou apresentem alterações na parede celular (Wolinsky, 1980 *in* Garcia e Gutiérrez, 1996b). Enquanto nas lesões exsudativas (cavitárias), como o número de bacilos é muito elevado, o ZN constitui uma boa ferramenta de diagnóstico, nas lesões proliferativas (granulomas), com um número reduzido de bacilos, perde importância em termos de diagnóstico (Sánchez *et al.*, 2008).

As técnicas de imunohistoquímica, principalmente a Avidina-Biotina-Peroxidase (AB-P), melhoram a sensibilidade e a capacidade de detecção de micobactérias quando estas se encontram em número reduzido ou com alterações na sua parede (Garcia e Gutiérrez, 1996b; Ulrichs *et al.*, 2005, Sanchez *et al.*, 2011). A AB-P demonstrou maior sensibilidade do que o ZN no diagnóstico da tuberculose caprina (Garcia e Gutiérrez, 1993 e 1996b) mas também não permite a distinção entre cortes

histológicos de *M. bovis* e outras micobactérias patogénicas (Kobayashi *et al.*, 1989; Geisel *et al.*, 1994; Garcia e Gutiérrez 1993 e 1996b). As reacções cruzadas constituem o principal problema da utilização de anticorpos policlonais. O desenvolvimento de uma ampla bateria de anticorpos monoclonais poderia ultrapassar este problema (Sánchez *et al.*, 2008). A utilização na prova da AB-P de um anticorpo monoclonal contra o antigénio MPB70 específico de *M. bovis* foi ensaiada em amostras de bovino com tuberculose, mas com o inconveniente de não detectar as micobactérias abaixo das 10<sup>5</sup> U.F.C/ml (Corner *et al.*, 1988).

### 3.8. Controlo do foco

Tendo em conta os resultados da IDT simples e o carácter singular dos casos a DGV optou pelo abate total dos efetivos, com a indemnização dos produtores. Foi também ordenada uma desinfecção das instalações e um vazio sanitário de 6 meses.

Esta estratégia é o esquema básico de controlo da tuberculose na espécie bovina a nível europeu e na espécie caprina em alguns países (ex. Espanha, França, Reino Unido e Irlanda): detecção de animais infectados e posterior sacrifício, juntamente com a execução de uma série de medidas sanitárias e a não movimentação do gado não saneado.

Um facto importante decorrente da aplicação da tuberculina é que nas fases finais dos planos de erradicação, quando a prevalência da infecção é reduzida, o valor previsível de um resultado positivo decresce devido em causa a credibilidade do teste (Schliesser, 1991 *in* Garcia, 1996). Assim, em fases adiantadas dos planos de erradicação esta prova pode não ser a mais adequada, porque tem essencialmente um valor retrospectivo, funcionando bem em explorações infectadas mas não nas explorações livres de tuberculose ameaçadas de re-infecção (Collins, 2006). Porém existem outras causas que contribuem para a persistência da infecção e correspondente insucesso dos planos baseados nos pressupostos referidos anteriormente (Tabela 26).

**Tabela 26** – Razões do insucesso dos planos de erradicação da tuberculose animal  
(Corner, 1994; Morris et al., 1994; Smith, 2006; Duarte, 2008; Naranjo *et al.*, 2008)

<b>Dificuldades de erradicação da tuberculose nos animais domésticos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Presença de reservatórios domésticos ou silváticos da infecção;</li><li>- Controlo inadequado da movimentação animal;</li><li>- Dificuldades de ordem técnica: realização e/ou leitura incorrecta, dificuldade de contenção de animais em regime extensivo duas vezes no espaço de 72 horas, má conservação ou exposição à luz solar das tuberculinas e a variabilidade associada ao factor humano na medição da espessura da pele;</li><li>- Limitações da tuberculinização: presença de falsos negativos no rebanho e possibilidade de a reacção ser diferente consoante a estirpe envolvida;</li><li>- Isolamento incompleto ou tardio dos animais positivos à IDT, permitindo novos contágios;</li></ul>

Existem determinadas características da tuberculose caprina que devem ser tomadas em conta em qualquer plano de erradicação e controlo elaborado para esta espécie. Em primeiro lugar os factores relacionados com o contágio e transmissão da doença: a progressão das lesões em alguns animais pode ser muito rápida (Garcia, 1996), o que conduz ao aparecimento, num período breve de tempo, de grandes eliminadores de bacilos. Este aspecto tem especial importância nos caprinos e pode ser uma das causas da rápida difusão da doença nos rebanhos (Garcia e Gutiérrez, 1996a). Aliás vários estudos confirmaram a presença de lesões exsudativas, com cavernização e um elevado número de bacilos em lesões provenientes de caprinos com tuberculose (Bernabé e tal., 1991a; Gutiérrez, 1995 e Mench, 1995 *in* Garcia e Gutiérrez, 1996<sup>a</sup>, Sanchez *et al*, 2011). A má alimentação, doenças intercorrentes, a presença de falsos-negativos nos rebanhos e a mudança de exploração, também contribuem para uma rápida difusão da doença nos caprinos (Garcia e Gutiérrez, 1996a). Também a elevada prevalência da doença nos efectivos atingidos é uma particularidade da doença nesta espécie. Finalmente, também é importante referir a menor experiência que se tem nesta espécie sobre as possibilidades de diagnóstico e os próprios critérios de interpretação em provas clássicas como a IDT (Garcia, 1996).

No caso espanhol, apesar de existirem planos de controlo há mais de 20 anos, os números da tuberculose caprina continuam a ser preocupantes.

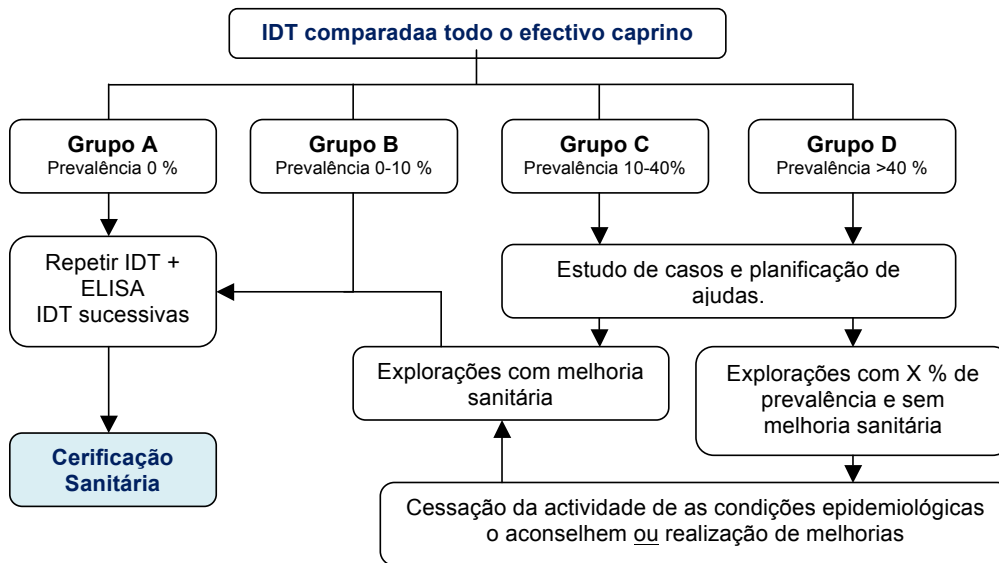
**Tabela 27** – Dificuldades e pontos – chaves do controlo da tuberculose caprina em Espanha

(Fonte: Garcia, 1996).

Dificuldades dos planos	Pontos-chaves do controlo
Controlo heterogéneo e irregular nas diferentes comunidades autónomas;	IDT regulares: a cada 3 meses até eliminar todos os animais positivos, seguidos de intervalos de 6 meses durante pelo menos 4 controlos negativos. Depois, intervalos anuais; Utilizar a IDT comparada apenas quando a prevalência da doença for < 5%;
Critérios excessivamente amplos na interpretação da IDT comparada que permitem a perpetuação dos falsos negativos nos rebanhos;	Critérios mais estritos na interpretação da IDT;
Intervalo de tempo excessivo desde o diagnóstico até ao isolamento e abate;	Rápida separação e abate dos animais positivo;
Não realização da IDT aos animais de reposição;	IDT de todos os animais de reposição independentemente da idade;
Ténue controlo da movimentação de animais nas explorações infectadas;	IDT de todos os animais adquiridos no momento em que chegam à exploração;
Ausência de critérios uniformes para definir o nível de prevalência a considerar para eliminar uma exploração completamente;	
Intervalos entre IDT superiores a um ano;	Se depois de vários controlos negativos surgir um número baixo de animais positivos (geralmente, reacções débeis), devem ser isolados dos restantes animais e realizada, 2 a 3 meses depois, uma IDT comparada. Se der positiva, devem ser abatidos e fazer-se uma IDT imediata ao efectivo.
	Limpeza e desinfecção das instalações;

Devido a razões conjecturais, falta de meios, falta de pessoal, pelo temor de eliminar uma forma de economia em zonas desfavorecidas, entre outras (Tabela 27), a aplicação do método tradicional de diagnóstico e abate não se tem revelado eficaz. De qualquer modo, uma campanha de erradicação da tuberculose caprina requer a adaptação das estratégias de controlo existentes (Bezós *et al.*, 2012a), assim a IDT é um ponto-chave no combate à tuberculose caprina (Garcia, 1996). Contudo, Bezós e colaboradores (2009) referem a necessidade de utilizar provas combinadas (IDT e IFN- $\gamma$ ) para um correcto diagnóstico da tuberculose caprina.

A aplicação do método de Bang, que recorre ao abate parcial, sugerido por Peris (*in* Garcia, 1996) tem como grande inconveniente a manutenção do risco zoonótico. Garcia (1996) defende que a realização no início desse programa de erradicação da prova de ELISA, ajudaria a eliminar os caprinos com elevada resposta humoral que são simultaneamente os maiores excretores de bacilos e os animais mais perigosos sob o ponto de vista do contágio. Recentemente Pardo e colaboradores (2008) propuseram um modelo de programa sanitário mais estruturado, em que o responsável máximo pela elaboração do plano passa a ser o produtor (Figura 35).



**Figura 35**– Modelo de programa sanitário contra a tuberculose caprina  
(Fonte: Pardo *et al.*, 2008).

Os fundamentos base para iniciar este programa são: formação dos produtores, identificação de todos os animais, controlo da movimentação animal e conhecimento das explorações indemnes (A) e com baixa prevalência (B). Estes dois grupos serão sujeitos ao método de sanidade tradicional e constituem a base populacional para repovoamento dos outros rebanhos. Nas explorações de média (C) ou elevada (D) prevalência, os animais positivos não serão sacrificados, a menos que o produtor o proponha. Nessas explorações, para além do impedimento da movimentação animal, adoptar-se-ão medidas para melhorar a sua classificação sanitária como a pasteurização de colostro, criação separada do gado adulto dos caprinos de reposição e medidas adicionais de higiene. Nos grupos A, B e C- voluntários serão realizadas as provas de IDT comparada e a prova de ELISA. A partir daí realizar-se-ão IDT a cada 4 meses nas explorações positivas e anual nas certificadas. Há medida que as explorações C e D desçam a sua prevalência são progressivamente incorporadas no programa sanitário tradicional.

A planificação de ajudas prevista neste modelo deve ser, entre outros, em função dos seguintes aspectos: (a) explorações caprinas como única fonte de rendimento familiar; (b) explorações modernas e/ou tecnicamente rentáveis; (c) explorações de famílias jovens e com projecção de futuro; (d) explorações sujeitas a programas de melhoramento genético; e (e) explorações em zonas desfavorecidas e

de necessidade ambiental. Em suma, o modelo proposto por estes autores, pretende modular os gastos e evitar um efeito traumático sobre o número de explorações e seus efectivos, embora alargando o tempo necessário para atingir os objectivos de erradicação da tuberculose caprina.

A aplicação de modelos baseados no método de Bang justifica-se em alguns países em vias de desenvolvimento ou em regiões muito específicas, onde a adopção das medidas sugeridas pela OMS é incomportável sob o ponto de vista social e económico. De outro modo, não negligenciando, que qualquer programa de controlo da tuberculose se deve adaptar às condições sócio-económicas e aos meios disponíveis, a defesa da saúde pública deve prevalecer, e estes programas devem privilegiar a eliminação do risco zoonótico através do abate compulsivo dos animais positivos às provas consideradas mais eficazes. Não esquecendo, por outro lado, as dificuldades logísticas na aplicabilidade do método, como a necessidade de separação física real entre os animais, principalmente nos sistemas de produção extensiva, e os custos a ela associados em termos de manuseio, alimentação e criação de estruturas.

Finalmente importa ainda considerar o papel que os caprinos podem representar em termos da epidemiologia da tuberculose e equiparar em termos legislativos a infecção por *M. caprae* com a aplicada a *M. bovis* (Rodríguez *et al.*, 2011). Os caprinos em áreas onde exista tuberculose nos animais domésticos ou selvagens, na ausência de uma vigilância efetiva podem permanecer despercebidos com a doença (Shuralev *et al.*, 2012). Napp e colaboradores (2013) defendem ainda que numa fase adiantada da erradicação da tuberculose bovina o papel da tuberculose caprina deve ser tida em consideração.

Por outro lado, alguns autores consideram que sempre que ocorrerem casos de tuberculose bovina devem ser ter sido em conta possíveis contactos com outros animais domésticos (Cousins *et al.*, 1993; Cousins, 2001) com especial significância quando há co-habitação de bovinos e caprinos (Shanahan *et al.*, 2013) fundamentando o Reg. (CE) 853/2004 que estipula o rastreio sistemático dos caprinos nessas condições.

#### 4. Conclusões e considerações finais

Na actualidade, a tuberculose vem adquirindo cada vez maior importância em termos de saúde pública e animal. Contrariamente à ideia antigamente difundida na comunidade médico-veterinária, os caprinos não só não são resistentes à infecção pelos agentes etiológicos da tuberculose, como podem infectar-se e desenvolver quadros lesionais que conduzem a elevadas mortalidades nos efectivos atingidos.

A tuberculose caprina tem como base o modelo dos bovinos. No entanto, têm surgido esforços nos últimos anos, por parte de alguns autores, no sentido de se compreender melhor a especificidade da tuberculose nesta espécie. Assim, com este trabalho, pretendemos salientar a importância da tuberculose nos caprinos, através da descrição de dois surtos ocorridos no Nordeste de Portugal e contribuir para caracterização do quadro clínico e lesional desta doença. Pretendemos ainda salientar a importância da espécie caprina na epidemiologia da tuberculose, já que os caprinos podem ser responsáveis pela transmissão da doença ao homem (um trabalhador da exploração 2 teve de receber tratamento médico) e, por outro lado, esta espécie, não sendo alvo de campanhas sistemáticas de erradicação pode vir a ocupar, no futuro, um espaço epidemiológico até aqui preenchido pelos bovinos.

O quadro clínico descrito nestes surtos foi caracterizado por um processo respiratório crónico responsável por uma elevada mortalidade, ao longo de todo o ano. O quadro macroscópico e microscópico foi semelhante ao descrito em várias publicações de uma equipa de investigadores espanhóis. Foram encontradas lesões granulomatosas de complexo primário, completo e incompleto, nos pulmões e intestino, bem como alguns casos de tuberculose generalizada. Os granulomas apresentavam diferentes características histológicas. Em alguns animais, observaram-se nos órgãos afectados um ou mais granulomas com necrose de caseificação e calcificação distrófica central, rodeada por macrófagos, células epitelióides, linfócitos, plasmócitos e células gigantes de tipo Langhans. Em outros animais, os granulomas apresentavam escassa necrose de caseificação ou mesmo ausência da mesma, com predomínio de células idênticas às descritas. Nos casos em que a caseificação era mais evidente, a quantidade de bacilos observada, após coloração de Ziehl-Nielsen, era substancialmente maior.

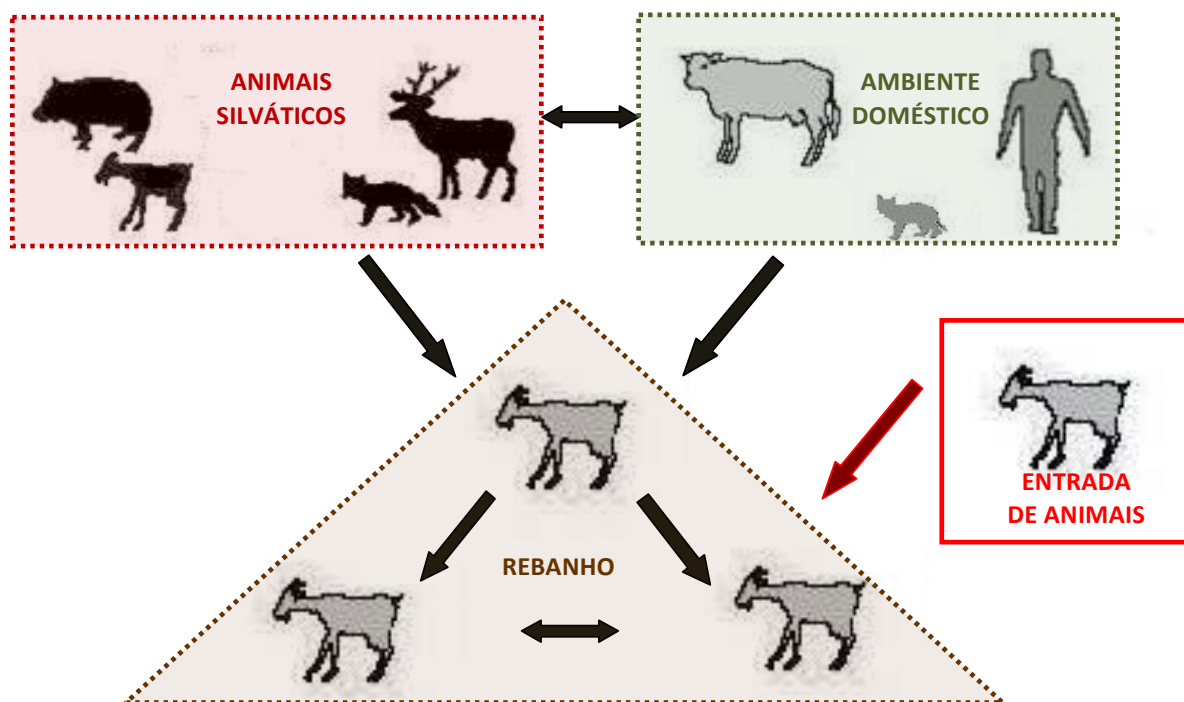
A liquefacção dos granulomas (“amolecimento do caseo”) e a formação de cavernas nos pulmões foram encontradas em vários casos de tuberculose caprina e correspondem a lesões histológicas com caseificação evidente e elevado número de bacilos. Assim, tal como foi referido, a rápida progressão das lesões conduz à

existência, num curto período de tempo, de animais eliminadores de bacilos em grandes quantidades. Estes factos, associados às condições de estabulação descritas que propiciam um estreito contacto entre os animais, podem ser responsáveis pela rápida difusão da doença nos efetivos, sobretudo, porque a principal via de infecção foi a aerógena.

Durante o período em que decorram os surtos vários problemas foram encontrados:

- **Atraso no diagnóstico:** que ficou a dever-se a vários factores, de entre os quais salientamos, a ausência de lesões características nas primeiras necropsias, o quadro clínico inespecífico e a incontornável demora na obtenção de resultados do exame microbiológico.
- **Atraso na tomada de decisões pelas entidades oficiais:** pela ausência de planos de erradicação e controlo, pela inexistência de indemnizações para os produtores e pela pouca familiarização com a doença nos caprinos, nomeadamente no que respeita à sua rápida evolução e graves consequências .
- **Abate tardio:** provocado pelo problema anterior, teve graves consequências económicas e sanitárias, algumas das quais impossíveis de determinar, nomeadamente, os muitos animais mortos e/ou moribundos, que o dono (na exploração 1) não conseguiu recolher e ficaram pela montanha à mercê de animais silvestres carnívoros.
- **Recolha de dados:** os dados apresentados neste trabalho implicaram um acompanhamento exaustivo dos casos desde a fase de diagnóstico ao abate, nomeadamente com a realização de necropsias, envio de amostras, realização e leitura da IDT e acompanhamento do abate sanitário. Só nesta última fase foi possível reunir de forma sistemática os dados de necropsia e colher as amostras para o estudo histopatológico que se apresenta no trabalho. A obtenção de dados relativos aos casos de tuberculose em caprinos em Portugal junto da DGAV mostrou-se infrutífera.
- **Não se determinou a origem do surto:** Na exploração 1 a realização do inquérito epidemiológico (MOD 758/DGV, aplicado à tuberculose bovina) não foi suficiente para indicar qual a origem do foco. A identificação do spoligotipo (muito comum em Portugal e em Espanha) também por si só não dá garantias quanto à origem do foco.

Relativamente à origem do surto nesta exploração, são várias as possibilidades desde os animais silvestres, aos domésticos ou ao próprio homem (Figura 36).



**Figura 36** – Possíveis fontes de transmissão no surto provocado por *Mycobacterium caprae* nos rebanhos de caprinos em estudo.

Na exploração 1, as duas pessoas que contactavam directamente com os animais (ambas com mais de 60 anos), podiam ser responsáveis pela transmissão aos caprinos, quer devido a uma infecção recentemente adquirida, quer pela reactivação de uma infecção latente antiga. Para afastar essa possibilidade, foram aconselhadas a contactar o médico de família.

A ausência de contacto com outros ruminantes domésticos e a prevalência inexistência de casos de tuberculose bovina na região em questão nos últimos anos parece excluir a fonte de infecção a partir dos ruminantes domésticos. Também o papel dos carnívoros domésticos, especialmente dos felinos, não deve ser negligenciado, especialmente pelo seu papel como perpetuadores da doença.

Em Portugal, o desconhecimento sobre a situação da tuberculose na fauna silvestre e a sua real influência na tuberculose animal é por demais evidente. O estreito contacto que o efectivo de caprinos mantinha com ruminantes silvestres torna esta hipótese como a mais provável. Contudo, estudos mais aprofundados serão necessários, desde logo para identificar possíveis reservatórios silváticos que poderão

a todo o momento estar na origem de novos focos da doença. A associação de técnicas moleculares (ex. spoligotipagem) a outros dados epidemiológicos poderia melhorar a compreensão que temos sobre a doença.

O segundo surto teve características diferentes. O efetivo era originalmente oriundo de Espanha e foi comprado por um produtor da região centro (Castro Daire) de onde transitaram cerca de 150 animais para a exploração 2. Após o diagnóstico de tuberculose caprina nesta exploração e estudo epidemiológico subsequente diagnosticou-se também tuberculose caprina aos restantes animais na exploração de Castro Daire. Apesar de não haver confirmação laboratorial os dados epidemiológicos apontam para a origem do surto ser a importação de animais (Figura 36) do nosso país vizinho. Temos conhecimento através de colegas de outros casos com contornos semelhantes no Alentejo (ex. um recente em Montemor-o-Novo numa exploração de 600 animais) o que levanta questões quanto à circulação de animais entre países e à ausência da exigência em Portugal de certificação sanitária de “indemne” relativa à tuberculose caprina na importação de animais de países com reconhecida elevada prevalência da doença.

Nestes surtos destacam-se a quantidade de casos de tuberculose mamária observados, o que poderia constituir um factor potenciador da disseminação da doença, quer aos animais mais jovens, quer ao Homem, através do leite ou seus derivados.

Neste trabalho, tratando-se de um estudo de apenas dois casos, tentámos não cair na tentação fácil de fazer extrapolações baseadas nas observações e dados recolhidos e, mais do que respostas, pretendemos levantar questões:

- Qual a prevalência da tuberculose caprina em Portugal? Será que apenas se resume aos casos descritos e a mais alguns casos esporádicos de que temos conhecimento? Ou estes casos são a ponta do *iceberg*? A sensibilidade das nossas raças autóctones é elevada?
- Quais os melhores métodos para diagnóstico em laboratório e na exploração? Que agentes estão implicados?
- Que implicações pode ter na saúde humana? Justifica-se a extensão do plano de erradicação da tuberculose aos caprinos?
- Qual importância dos animais domésticos e silváticos na tuberculose? Poderão os animais silváticos constituir um reservatório importante do agente e inviabilizar a erradicação da doença nos animais de produção? Serão necessárias medidas especiais de vigilância desta doença na fauna silvática?

Muitas outras questões poderiam ser levantadas, apenas expomos as que consideramos mais pertinentes. Por outro lado, pretendemos sugerir algumas medidas de controlo e vigilância desta doença nos caprinos:

- No que diz respeito ao diagnóstico de tuberculose caprina num efectivo até então “indemne”, são importantes os aspectos clínicos e as lesões encontradas na necropsia, que deve ser realizada de forma sistemática com observação cuidadosa das lesões macroscópicas. A confirmação, no entanto, é sempre feita pela análise laboratorial de amostras dessas lesões.
- É fundamental a correcta aplicação dos planos de erradicação e controlo da tuberculose bovina onde já se incluem os testes de pré-movimentação, a vigilância atenta de eventuais casos clínicos e a inspecção sanitária cuidadosa nos matadouros de todos os ruminantes domésticos.
- Sempre que se justifique devem estender-se as medidas previstas nesses planos aos caprinos, cumprindo o estipulado no Reg. (CE) 853/2004. No nosso entendimento, o plano nacional de erradicação da tuberculose deveria incluir os caprinos, não só nos casos em que são co-habitantes com bovinos, mas também quando existam suspeitas clínicas ou a situação epidemiológica o justificar. No caso de abate, a indemnização aos criadores deveria ser célere.
- Apesar de, nos casos em estudo, a IDT simples ter apresentado uma sensibilidade elevada e de ter servido os objectivos pelos quais foi realizada, reconhece-se que é necessário determinar quais são os critérios apropriados para a interpretação dos resultados desta prova em caprinos.
- Qualquer programa de controlo e erradicação da tuberculose caprina deve ter em conta as infecções mistas, nomeadamente com paratuberculose; nesses efectivos a escolha das ferramentas de diagnóstico adequadas são fundamentais. Assim, é necessário conhecer o nível de infecção por paratuberculose nos efectivos uma vez que hoje é aceite que esta interfere com os resultados da IDT e investigar quais as técnicas de diagnóstico complementares mais adequadas na tuberculose caprina.
- Deve proceder-se a um maior controlo na importação de animais com a exigência de testes de pré-movimentação e de classificação sanitária de “indemne” de tuberculose a todos os efectivos caprinos oriundos de países onde a prevalência de tuberculose caprina não seja nula.
- Qualquer que seja o papel das espécies silvestres na epidemiologia da tuberculose, o risco de transmissão a animais domésticos e ao homem existe e será fundamental considerá-lo na elaboração e implementação futura de medidas de controlo e erradicação eficazes da doença.

- O desenvolvimento de provas mais expeditas no diagnóstico da tuberculose animal é fundamental, especialmente no caso da tuberculose caprina. O carácter excepcional que parece ter hoje no nosso país, justifica uma resposta laboratorial urgente para que, em articulação com as entidades oficiais (i.e. DGAV, DRSV e DIV) e privadas (i.e. OPP e Médicos Veterinários assistentes das explorações), se possam tomar medidas para a rápida eliminação dos focos.
- É importante a monitorização dos casos de tuberculose humana, principalmente nos criadores de gado, trabalhadores de matadouros e Médicos Veterinários.
- A variabilidade genética das diferentes espécies do *Complexo Mycobacterium tuberculosis* justifica a importância do diagnóstico e identificação das estirpes e variantes envolvidas em todos os casos de tuberculose, em humanos ou em animais, pelas implicações epidemiológicas que pode ter. Por isso é necessária a melhoria contínua e o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular que se afirmam como o futuro da luta contra a tuberculose.

Aparentemente, a tuberculose em caprinos é actualmente pouco comum em Portugal. Mas os casos descritos reforçam a necessidade de promover uma vigilância activa desta doença nesta espécie por parte de todas as entidades responsáveis pela saúde animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha P. & Szyfres B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. Vol.I. 3ª ed. Washington.
- Acosta Real, F.; León, L.; Déniz, S.; Ramirez, A.; Rosario. I. (1998). Isolation of *Mycobacterium kansasii* from a tuberculin positive goat. *Veterinary Record*. 142. 195-196.
- Acosta, B., Real, F., León, L., Deniz, S., Ferrer, O., Rosario, I., (2000) ELISA for anti-MPB70: an option for the diagnosis of goat tuberculosis cause by *Mycobacterium bovis*. *Aust Vet* 78, 423-4.
- Acosta, B.; Real, F.; León, L.; Déniz, S.; Ramirez, A.; Rosario. I. (2000b). Seroprevalência de la tuberculosis caprina en las islas de Gran Canaria y Lanzarote. Estudio retrospectivo. *Med Vet* vol.17(3).63-68.
- Aguilar, I., Granados, E., Palacios, R., Martin, E., Sanchez, M., & Santos, J. (2007). Fatal case of tuberculous chancre in a patient with AIDS. *Journal of Infection* 54. 137-139.
- Alaku, S. e Moruppa, M. (1993). Tuberculosis condemnations in livestock slaughtered for meat in northeastern Nigeria. *Prevent Vet Med* 15. 67-72
- Alvarez, J., deJuan, L., Bezos, J., Romero, B., Saez, J.L., Reviriego, G.F.J., Briones, V., Moreno, M.A., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A., (2008). Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Veterinary Microbiology* 128, 72–80.
- Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden DJ & D Cousins (1996). Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clinical Microbiology* 34 (11): 2734-40.
- Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G., Dominguez, L., (1999) *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 3, 1263-1273.
- Aranaz, A., Cousins D., Martens, A., Dominguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb.Nov.,sp.Nov. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, v.53, n.6. 1785-1789.
- Aranaz A., Juan L, Montero N, Sánchez C, Galka M, Delso C, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI, Briones V, Mateos A, Domínguez L. (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol* 42: 2602–2608.
- Aranaz A; De Juan; Bezos J; Alvarez J; Romero B; Lozano F; Paramio J L; López-Sánchez J; Mateos A; Domínguez L (2006) Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary research* 2006;37(4):593-606.
- Bakshi, C.S., Shah, D.H., Verma, R., Singh, R.K., Malik, M. (2007). Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Veterinary Microbiology* 123 (1-3):282.
- Balseiro, (2001). Estudio epidemiológico de la tuberculosis caprina en Asturias utilizando la técnica del gamma-interferon. Jornadas científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Sevilla (España), 20-22 sep .
- Bartos, M.; Falkinham, O; e Pavlink, I. (2004). Mycobacterial catalases, peroxidases and superoxide dismutases and their effectson virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria- a review. *Veterinary Medicine- Czech* 49. 161-170.
- Belknap, E. (2005). Enfermidades do sistema respiratório. In *Clínica de ovinos e caprinos*. Editado por Pugh, D. Roca. 140-141.
- Benesi, F., Pinheiro, R., Maiorka, P., Sakamoto S., Roxo, E., Benites, N., Birgel Junior, E., Gregory, I.. (2008). Relato de caso: tuberculose em caprino (*capra hircus*). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.2, p.217-220.

- Benet, J. (2006). La tuberculose animale. Maladies Contagieuses. Ecoles Nationales Veterinaires Francaises. Merial. 1-72.
- Bernabé, A.; Gómez, A.; Navarro, A.; Gómez, S.; Sidrach, J.; Menchen, V.; Vera, A.; Sierra, A. (1991a). Morphopathology of caprine tuberculosis I. Pulmonary Tuberculosis. *Annales de Veterinaria de Murcia*, v.6/7. 9-20.
- Bernabé, A.; Gómez, A.; Navarro, A.; Gómez, S.; Sidrach, J.; Menchen, V.; Vera, A.; Sierra, A. (1991b). Morphopathology of caprine tuberculosis II. Tuberculosis Generalizada. *Annales de Veterinaria de Murcia*, v.6/7. 21-29.
- Bernabé et al (1991c). Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Ruminant Research* 5. 377-390.
- Bernabé A.; Navarro, J.; Menchén V.; Gomez S., Sánchez J. (1997). Diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis caprinas. Infección natural simple y doble. Producción y salud en pequeños ruminantes. Universidad de Córdoba. 109-121.
- Bezos, J., Romero, B., Castellanos, E., de Juan, L., Mateos, A., Aranaz, A., Dominguez, L., 2009. *Tuberculosis in goats: diagnostic test results and correlation with macroscopic lesions*. In: Proceedings of the 5th Mycobacterium bovis Conference, Wellington, New Zealand, p. 103
- Bezos, J., de Juan, L., Romero, B., Álvarez, J., Mazzucchelli, F., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A., 2010a. *Experimental infection with Mycobacterium caprae in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 133, 269– 275.
- Bezos, J., Álvarez, J., Juan, L.D., Romero, B., Rodríguez, S., Castellanos, E., Saéz-Llorente, J.L., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A., 2010b. *Factors influencing the performance of an interferon-γ assay for the diagnosis of tuberculosis in goats*. *The Veterinary Journal*. doi:10.1016/j.tvjl.2010.09.026.
- Bezos J, Álvarez J, de Juana L, Romeroa B, Rodríguez S, Fernández-de-Mera I, Glyn Hewinson R, Vordermeier M, Mateosa A, Domínguez L, Aranaz A, 2011. *Assessment of in vivo and in vitro tuberculosis diagnostic tests in Mycobacterium caprae naturally infected caprine flocks*. *Preventive Veterinary Medicine* 100:187–192
- Bezos J., Álvarez J., Romero B., Aranaz, A., de Juan, L. 2012a. *Tuberculosis in goats: assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays*. *The Veterinary Journal* 191: 161-165.
- Bezos J., Álvarez J, Mínguez O, Marqués S, Martín O, Vigo V, Pieltain C, Romero B, Rodríguez S, Casal C, Mateos A, Domínguez L, de Juan L. 2012b. *Evaluation of specificity of tuberculosis diagnostic assays in caprine flocks under different epidemiological situations*. *Research in Veterinary Science* 93: 636–640.
- Biberstein, E. e Hirsh, D. (1999). Mycobacterium Species: the agents of animal tuberculosis. In *Veterinary microbiology*. Blackwell Science. 158-164.
- Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA.(2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res*; 36: 411- 36.
- Blaas SH, Bohm S, Martin G, Eler W, Gluck T, et al. (2003) Pericarditis as primary manifestation of Mycobacterium bovis SSP. caprae infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 431–433.
- Boniotti MB, Gorla M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A,. 2009. *Molecular typing of Mycobacterium bovis strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number-tandem- repeats for a geographic optimized genotyping*. *J Clin Microbiol*.;47:636–44.
- Briones V, Juan L, Sánchez C, Vela A-I, Galka M, Montero N, Goyache J, Aranaz A, Mateos A., Domínguez L. (2000). Bovine tuberculosis and the endangered lynx. *Emerg Infect Dis* 6: 189-191.
- Brosch, R.; Gordon S.; Marmiesse, M; Brodin, P, et al (2002). A new evolutionary scenario for the M. tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sciences* 99. 3684-3689.
- Buddle, B.M., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Andersen, P., DE Lisle, G.W. (2001). Use of ESAT-6 in the interferon-γ test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Veterinary Microbiology* 80, 37-46.
- Cadmus SI, Adesokan HK, Jenkins AO, van Soolingen D. 2009. Mycobacterium bovis

- and M. tuberculosis in goats, Nigeria. *Emerg Infect Dis.* Dec;15(12):2066-7.
- Carmichael, J. (1941) Bovine tuberculosis in tropics with special reference to Uganda. *Vet j* 97. 329.
  - Caro , M.; Gallego , M.; Buendía , A. Del Rio, L.; Seva J.; Navarro, J. (2008). Differences in Lymphocyte Subpopulations from Peripheral Blood and Lymphoid Organs in Natural Caprine Tuberculosis Infection. *Journal of Veterinary Medicine Series B Volume 48 Issue 2.* 81 – 88.
  - Cataldi, A. & Romano, I. (2007). Tuberculosis caused by other members of the M. tuberculosis complex. In *Tuberculosis: from basic science to the patient care.* 283-314. Disponível em [www.tuberculosisistextbook.com](http://www.tuberculosisistextbook.com) acessado a 29 de Agosto de 2009.
  - Carter G. (1988). *Mycobacteria. Fundamentos de Bacteriologia e micologia veterinária.* Capítulo 25. Editora Roca. 186-194.
  - Cassydy, J. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animals models. *Veterinary Microbiology* 112. 151-161.
  - cattle. *Tuberculosis* 81, 79-86.
  - Charleston, B., Hope, J.C., Carr, B.V., Howard, C.J., (2001). Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Record* 149,481-484.
  - Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 Nov;24(11):711-20.
  - Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Deneef, J.F., Cocito, C., Gala, J.L., (2000) Duplex PCR for differential Identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium* and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* in formalin-fixed paraffinembedded tissues from cattle. *Journal of clinical microbiology*, 3048-3054.
  - Collins DM, Radford AJ, de Lisle GW, Billman-Jacobe H (1994). Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet. Microbiology* 40. 83-84.
  - Collins, JD. (2006). Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Veterinary Microbiology* 112: 369-381.
  - Corner, LA. (1994). Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiology* 40:53-63.
  - Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. (1998) .Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4: 59-70.
  - Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., Egan, J., Griffin, J. (1999). Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J Clin Microbiol* 37, 3217-3222.
  - Cousins, D.V., Wilton, S.D., Francis, B.R. (1991). Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 27, 187-95.
  - Cousins D.V., Francis B.R., Casey R. & Mayberry C. (1993). *Mycobacterium bovis* infection in a goat. *Aust. vet. J.*, 70 (7), 262-263.
  - Cousins, D.V. (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech* 20, 71-85.
  - Cousins, D.V., Florisson, N. (2005) A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24 (3), 1039-1059.
  - Cousins, D.; Huchzermeyer, H.; Griffin, J.; Bruckner, G.; Van Rensburg, I.; e Kriek, N. (2005). Tuberculosis. *Infection Diseases of Livestock. Oxford University Press.* 1973-1993.
  - Crawshaw, T.; Daniel, R.; Clifton-Hadley, R.; Clark, J.; Evans, H.; Rolfe, S.; De la Rúa-Domenech (2008). TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *The veterinary Record, July* 26. 127.
  - Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin test,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 81, 190-210.
  - Cvetnic Z., Spicic S., Katalinic-Jankovic V., Marjanovic S., Obrovac M., Benic M., Mitak m., Pavlik I.(2006). *Mycobacterium caprae*

infection in cattle and pigs on one family farm in Croatia: a case report. *Veterinárni medicína*, 51: 523-531.

- Cvetnic, Z.; Katalinic-Jankovic, V.; Sostaric, B.; Spicic, S.; Obrovac, M.; Marjanovic, S.; Benic, M.; Kirin, B.K.; Vickovic, I. (2007). *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v.11, n.6: 652-658.
- Daniel R, Evans H, Rolfe S, de la Rua-Domenech R, Crawshaw T, Higgins RJ, Schock A, Clifton-Hadley R. 2009. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in Great Britain. *Vet Rec*. Sep 19;165(12):335-42.
- David, S., Portugal, C., Antunes, A., Calado, A., Cardoso, A., Barros, V., Sancho, L., Sousa, G.(2005) *Spoligotyping* e polimorfismo do gene *pncA*: Um cenário em duas etapas para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em Portugal. *Revista Portuguesa de Pneumologia*.535-556.
- de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, Dean, G.; Rhodes, G.; Coad, M.; Whelan, O.; Cockle, J.; Clifford, J.; Hewinson, R. E Vordermeier, M. (2005). Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infection and immunity* 73. 6467-6471.
- de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, Christiansen, K. & Clifford-Hadley, R. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 81. 190-210.
- Dean G, Rhodes S, Coad M, Whelan A, Cockle P, Clifford D, Hewinson R, & Vordermeier H. (2005) Minimum Infective Dose of *Mycobacterium bovis* in Cattle. *Infection and Immunity*, Vol. 73, No 10: 6467-6471.
- Deckwer, N. (1950). Tuberculosis in goats. *Berl Tierarztl Wochenschr* 11. 243-244.
- Delahay, R.; Cheeseman, Clifton-Hadley, R. (2001). Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *M. bovis* in the European badger (*Meles meles*) and others british mammals. *Tuberculosis* 81. 43-49.
- Deresa, B., Franz J., Conraths, Ameni, G. 2013. Abattoir-based study on the epidemiology of caprine tuberculosis in Ethiopia using conventional and molecular tools. *Acta Veterinaria Scandinavica* . 55:15.
- DGAV (2012). Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa. Portugal.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418. 700-707.
- Domenéch, P.(2003). Tendencias evolutivas de la brucelosis y tuberculosis animales en el periodo 1990-2000. Tesis Doctoral. *Universidad Autonoma de Barcelona – Facultad de Veterinaria*. 1-263.
- Duarte, E. (2008). Tuberculose Bovina: Detecção molecular e genotipagem de *Mycobacterium bovis*. Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária. 1-161.
- Duarte, E., Domingos., M., Amado, A. e Botelho, A. (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology* 130, 415-421.
- Duarte, E., Domingos., M., Albuquerque, T. Amado, A. e Botelho, A. (2007). Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de *Mycobacterium bovis* de uma exploração no Alentejo RPCV (2007) 102 (563-564) 299-303
- Duarte, E., Domingos., M., Amado, A., Cunha, MV. e Botelho, A. (2010). *MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of M. bovis and M. caprae strains defined by spoligotyping*. *Veterinary Microbiology* 143, 299-306.
- Durr, P.A., Hewinson, R.G., Clifton-Hadley, R.S (2000a). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev Sci Tech* 19 (3), 675-88.
- Durr, P.A., Hewinson, R.G., Clifton-Hadley, R.S (2000b). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev Sci Tech* 19 (3), 689-701.
- EFSA (2009). The Community Summary Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*. 173-174.

- Eisenach, K. (1994). Use of IS6110 insertion sequence for laboratory diagnosis and epidemiologic studies of tuberculosis. *Ann Emerg Med* 24: 450-453.
- Enarson, D. (2006). Introduction. Chapter 1. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2<sup>nd</sup> edition. Blackwell Publishing. 1-5.
- Erler W, Martin G, Sachse K, Naumann L, Kahlau D, Beer J,. 2004. *Molecular fingerprinting of Mycobacterium bovis subsp. caprae isolates from central Europe*. *J Clin Microbiol.*;42:2234–8.
- European Commission (2002). Report on Trends and sources of zoonotic agents in the European Union and Norway. Health & Consumer Protection Directorate-General. 31-40
- Fabre M, Koeck JL, Le Flèche P, Simon F, Hervé V, Vergnaud G, & Pourcel C. (2004). High genetic diversity revealed by variable-number tandem repeat genotyping and analysis of hsp65 gene polymorphism in a large collection of *Mycobacterium canettii* strains indicates that the *Mycobacterium* complex is a recently emerge clone of *Mycobacterium canettii*. *J. Clin Microbiology* 42 (7). 3248-3255.
- Falzon, D. & Ait-Belghiti, F. (2007). What is tuberculosis surveillance in European Union telling us? *Clinical Infectious Diseases* 44, 1261-1267.
- Fonseca,. (2005). Critérios para a interpretação da intradermotuberculização. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa. Portugal.
- Fonseca,. (2009). Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa. Portugal.
- Fonseca,. (2011). Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa. Portugal.
- Garcia, J e Marquês, R. (1989). Evaluación de la prueba de tuberculización intradérmica en el diagnóstico de la tuberculosis caprina. *Itea, EXTRA*. 166-168.
- Garcia M. (1996). Control de la Tuberculosis caprina. *Ovis: Tratado de patologia y produccion ovina N° 46*. 79-91
- Garcia M. & Gutiérrez C. (1996). Aspectos epidemiológicos y clínicos de la tuberculosis caprina. *Ovis: Tratado de patologia y produccion ovina N° 46*. 45-59.
- Garcia M. e Gutiérrez C. (1996b). Diagnóstico de la tuberculosis caprina. *Ovis: Tratado de patologia y produccion ovina N° 46*. 61-77.
- García, J. (1996). Patogenia de la tuberculosis caprina. *Ovis: Tratado de patologia y produccion ovina N° 46*. 23-30.
- Geisel O, Netter F, Hermanns W (1994). Specificity of immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens. *J. Vet. Med. B*. 41: 548-553.
- Gibson, L.; Hewinson, G.; Goodchild, T.; Watt, B.; Story, A.; Inwald, J.; Drobniewski, A. (2004). Molecular epidemiology of disease to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 42. 431-434.
- Goguet Y, de la Salmoniere, L HMi, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J & Gicque B (1997) Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* *Journal of Clinical Microbiology*, Sep 1997, 2210-2214, Vol 35, No. 9.
- Golden, G. (1921). Tuberculosis in milk goats. *JAVMA* 59. 79-81.
- Gómez, N., Gutiérrez, M.M., Geijo, M.V. e García Marín, J.F. (1998). Identificación y diferenciación de variantes de *Mycobacterium bovis* en la tuberculosis caprina. *Producción Ovina y Caprina XXIII*: 295-296
- Gonzalez, O.; Gutierrez, C.; Rodriguez, E. (1998). Etiología y diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Med.Vet* 15(10). 514-537.
- Grange J.M., Yates M.D. (1994). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection, *Vet. Microbiol.* 40: 137–151.
- Grange, J., Yates, M., Kantor, I. (1996). Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. 2<sup>nd</sup> edition. WHO/EMC/ZOO/96.4. 1-18.
- Grange, J. (2001). *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* 81: 71-77.
- Griffin J.M., Haehsy T., Lynch K., Salman M.D., McCarthy J., Hurley T. (1993). The association of cattle husbandry practices, environmental factors and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland, *Prev.Vet. Med.* 17: 145–160.

- Gutiérrez, C; e Garcia, F. (1993). Comparasion of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculosis lesions. *J. Comp. Path.* 109. 361-370.
- Gutiérrez M.& Juste R. (1996). Bacteriología del agente de la tuberculosis caprina. *Ovis: Tratado de patología y producción ovina N° 46.* 11-20.
- Gutierrez, M., S. Samper, M. S. Jimenez, J. D. van Embden, J. F. Marin, and C. Martin. (1997) Identification by spoligotyping of a caprine genotype in ***Mycobacterium bovis*** strains causing human tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 35:3328-3330
- Gutiérrez M., Tellechea J. & Garcia Marin J.F. (1998). Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet. Microbiol.*, 62 (4), 281-290.
- Haddad, N.; Durand, B. (2001) Interet et limites des differentes techniques de caracterisation des isolats. Exemple de la tuberculose. *Epidemiologie et Santé Animale* 39:43-57.
- Haddad N, Masselot M & Durand B (2004). Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications *Research in Veterinary Science* Volume 76, Issue 1: 1-18.
- Hewinson RG, Vordermeier HM, Smith NH, Gordon SV. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: A feeling for the organism. *Vet Microbiol.* 102:127-139.
- Hiko A, Agga GE. 2011. *First-time detection of mycobacterium species from goats in Ethiopia.* *Trop Anim Health Prod.* Jan;43(1):133-9.
- Hope, J.C., Thom, M.L., Villareal-ramos, B., Voredermeier, H.M, Hewison, R.G., Howard, C.J. (2005). Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clinical and Experimental Immunology* 141, 432-439.
- Huard; R.; de Oliveira, L.; Butler,W.; van Soolingen, D.; Ho, J. (2003). PCR- based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complexo on the basis of genomic deletions. *J Clinical Microbiology* 41 (4). 1637-50.
- Hughes, M. *et al* (1993). Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction amplified 16S rRNA gene sequences. *Journal Clinical Microbiology* 31. 3216-3222.
- Hurchezermeyer,H ; Brueckner, G.;van Heerder, A.; Kleeberg, H; van Rensburg, I.; koen, P.; Loveday, R.; (1994). Tuberculosis. In *infection Diseases of Livestock*. Edited by Coetzer, J; Thomsom and Justin, R. Oxford University Press
- Hutchings M., Harris S. (1997). Effects of farm management practices on cattle grazing behavior and the potencial for transmission of bovine tuberculosis from badgers to cattle. *Vet. Journal* 153. 149-162.
- Hutson, I.R. (1941) .Clinical Tuberculosis in a Goat\_ *Can J Comp Med Vet Sci.* September; 5(9): 259–262.
- Ikonomopoulos J, Aranaz A, Balaskas C, Sechi L, Gazouli M. (2006). Outbreak of acute tuberculosis in a goat herd; first report of *Mycobacterium caprae* isolation in Greece. *OJVR.* Volume 10 (2) . 108 – 115.
- Iyer, P.(1932). *Indian J vet sci* 11. 41-48 *itado por* Verma, R. (2006). The status of *M. bovis* in india.161-172. *In: Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Blackwell Publishing. 161-172.
- Jalava K, Jones JA, Goodchild T, Clifton-Hadley R, Mitchell A, Story A, Watson JM. (2007) No increase in human cases of *Mycobacterium bovis* disease despite resurgence of infections in cattle in the United Kingdom. *Epidemiol Infect* 135: 40-45.
- Jones, C.; Hunt, D.; e King. W. (1997). Tuberculosis. *Veterinary Pathology.* Lippincott Willians & Wilkins. 489-497.
- Kassa, GM, Abebe, F, Worku,Y, Legesse,M, Medhin,G Bjune, G., e Ameni, G. 2012. *Tuberculosis in Goats and Sheep in Afar Pastoral Region of Ethiopia and Isolation of Mycobacterium tuberculosis from Goat.* *Veterinary Medicine International.* Hindawi Publishing Corporation. Volume 2012, Article ID 869146, 8 pages

- Kazwala RR, Daborn CJ, Sharp JM, Kambarage DM, Jiwa SF, Mbembati NA. (2001) Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of cervical adenitis in Tanzania: a cause for concern. *Int J Tuberc Lung Dis*; 5: 87-91.
- Kel'dybaev, S. e Turkaeva, K. 1969. *Distribution of tuberculosis among sheep and goats*. *Veterinariia* 9, 38.
- Kidane D, Olobo JO, Habte A, Negesse Y, Aseffa A., Abate G, Yassin M, Bereda K. & Harboe M (2002). Identification of the causative organism of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia by PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4230-4.
- Kobayashi K, Blaser MJ, Brown WR. (1989). Immunohistochemical examination for mycobacteria in intestinal tissues from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 96: 1009-1015.
- Köler, H., Gyra, H., Zimmer, K., Dräger, K.G., Burkert, B., Lemser, B., Hausleithner, D., Cußler, K., Klawonn, W., Heb, R.G. (2001). Immune reactions in cattle after immunization with *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *Journal of Veterinary Medicine B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 48, 185-195.
- Kubica T., Rusch-Gerdes S., Niemann S. (2003). *Mycobacterium bovis* subsp. *Caprae* caused one-third of human *M. bovis* associated cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clinical Microbiology* 41, 3070-3077.
- Kwok, H.F., Scott, C.J., Snoddy, P., Buick, R.J., Johnston, J.A., Olwill, S.A., 2010. *Expression and purification of diagnostically sensitive myco- bacterial (M. bovis) antigens and profiling of their humoral response in rabbit model*. *Res. Vet. Sci.* 89, 41–47.
- Lage, A., Eliana Roxo, E., Muller, E., Poester, F., Cavalléro, J., Neto, J., Mota, P., Gonçalves, V. (2006). Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília-Brasil. 1-190.
- León, L. (1991). Principales enfermedades contagiosas en especies cinérgicas. *Manual de Ordenación y Gestión cinérgica*. IFEBA. 105-132.
- Lepper, A.W.D., Pearson, C.W., Corner, L.A. (1977). Anergy to tuberculin in beef cattle. *Australian Veterinary Journal* 53, 214-216.
- Liébana, E., *et al.*(1996). Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiology* 34 . 933-938.
- Liébana E, Aranaz A, Dominguez L, Mateos A, González-Llamazares O, Rodríguez-Ferri EF, Domingo M, Vidal D & Cousins D. (1997). The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain *Veterinary Microbiology* Volume 54, Issues 3-4, March: 223-233.
- Liebana, E., Aranaz, A., Urquia, J.J., Mateos, A., Domínguez, L. (1998). Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Australian Veterinary Journal* 76, 850–853.
- Lightbody, K., McNair, J., Neill, S., Pollock, J. (2000). IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunized and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Veterinary Microbiology* 75, 177-188.
- Lilembaum, W. (2000). Atualização em tuberculose bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 22. 145-151.
- LoBue, P. (2006). Public health significance of *M. bovis*. . Chapter 2. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2<sup>nd</sup> edition. Blackwell Publishing. 6-12.
- LoBue, P.A., Enarson, D.A., Thoen, C.O., 2010. *Tuberculosis in humans and animals: an overview*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 14, 1075– 1078.
- Lorazo, E. Sainero, F.J., Turrillo, F., Muñoz. 2012. *Estudio sobre la interferencia en el diagnóstico de tuberculosis de la vacunación con Gudair frente a la paratuberculosis em cabras de reposición*. Libro de actas XXXVII Jornadas SEOC 2012. pp. 273-275
- Lyashchenko, P., Pollock, J., Colangeli, R. , Gennaro, M.(1998). Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity* 66, 5344-5349.

- Manrique, G. (2004). Prevalencia da tuberculose caprina en la provincia de Barranca. Tesis para optar el título Profesional de Médico Veterinario. FMV Universidad Mayor de San Marcos-Lima. 34-43.
- Marassi, C., Almeida, C., Pinheiro, S., Vasconcellos, S., Lilenbaum, W., 2009. *The use of MPB70-ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in Brazil*. Veterinary Research Communications 33, 937–943.
- Martín, P.; León L. (1998). La tuberculosis: introducción a la enfermedad. Revisiones en Mastozoología. Galemys; 10(2). 36-46
- Martín-Atance P, Palomares F, González- Candela M, Revilla E, Cubero MJ, Calzada J, León-Vizcaíno L. (2005). Bovine tuberculosis in a freeranging red fox (*Vulpes vulpes*) from Doñana National Park (Spain). J Wildl Dis 41: 435–436.
- Martín-Atance P; León-Vizcaíno L; Palomares F; Revilla E; González-Candela M; Calzada J; Cubero-Pablo M J; Delibes M. (2006). Antibodies to Mycobacterium bovis in wild carnivores from Doñana National Park (Spain). Journal of wildlife diseases; 42(3):704-8.
- Matthews, J. (2009). Chronic weight loss. In: Diseases of the goat. Wiley-Blackwell. 145-146.
- McNair, J., Corbett, D., Girvin, R., Mackie, D., Pollock, J. (2001). Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. *Scandinavian Journal of Immunology* 53, 365-371.
- Menzies F.D., Neill S.D. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis, Vet. J. 160: 92–106.
- Miller, J.M., Jenny, A.L., Payeur, J.B. (2002) Polymerase chain reaction detection of Mycobacterium tuberculosis complex and Mycobacterium avium organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Veterinary Microbiology* 87, 15-23.
- Milne A. H. (1955). An outbreak of tuberculosis in goats in Tanganyika. *Vet. Rec.* 67, pp. 374–375.
- Mohan, R. (1950). Incidence of Tuberculosis in goats. *Indian Vet j* 27. 153-157.
- Monaghan, M.L., Doherty, M.L. Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J. (1994). The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 40, 11-124.
- Monies RJ, Cranwell MP, Palmer N, Inwald J, Hewinson RG, Rule B. (2000). Bovine tuberculosis in domestic cats. *Vet Rec*; 146: 407-8.
- Morris, R.S.; Pfeiffer, D.U.; Jackson, R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology* 40: 153-177.
- Napp S, Allepuz A, Mercader I, Nofrarías M, López-Soria S, Domingo M, Romero B, Bezos J, Pérez de Val B. 2013. *Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis*. *Vet Rec.* Jun 22;172(25):663.
- Naranjo V, Gortazar C, Vicente J, de la Fuente J. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of Mycobacterium tuberculosis complex. *Vet Microbiol.* 2008 Feb 5;127(1-2):1-9. Epub 2007 Oct 10.
- Neill S.D., Hanna J., O'Brien J.J., McCracken R.M. (1989). Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves, *Vet. Rec.* 124: 269–271.
- Neill, D.; Bryson, G. & Pollock, M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 81. 79-86.
- Niemann, S., Harmsen, D., Rusch-Gerdes, S., Richter, E., (2000). *Differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates by gyr B DNA sequence polymorphism analysis*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3231–3234.
- Niemann, S., Richter E., Russch-Gerdes S. (2002). Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 433–436
- Noordoek GT, Mulder S, Wallace P, van Loon AM (2004). Multicentre quality control study for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by nucleic acid amplification methods. *Clin Microbiol Infect.* Apr;10(4):295-301.
- O'Reill, L. (1969). Tuberculosis eradication – Some problems of the post atestation era. *Irish Vet Journal* 23. 140-148.

- O'Reilly, L.; Daborn, C. (1995). The epidemiology of Mycobacterium bovis infection in animals and man: a review. *Tubercule and lung disease* 76 Supplement. 1-46.
- Oh, P.; Granich, R.; Scott, J.; Sun, B.; Joseph, M.; Stringfield, C. et al. (2002). Human exposure following M. tuberculosis infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. *Emerg Infect Diseases* 8 (11). 1290-1293.
- OIE (2004). Bovine Tuberculosis. *In: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*, fifth ed. Office International des Epizooties, Paris (updated 23 July 2004), Chapter 2.3.3.
- Olive, D.; Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiology* 37. 1661-1669.
- Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A, Kunimoto D.(1993) DNA fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* Apr;167(4):975-978
- Pardo Mesas, J.P.; González García, G.; Garrido Carreño, J.;Parra Fernández, S. , García-Ruiz García, I. (2008). Modelo de programa sanitario para la lucha y control de la tuberculosis caprina con objetivo final de erradicación XXXIII Jornadas científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Almeria (España).24-27 Sep. 396-400.
- Parra, A., Larrasa, J., Garcia, A., Alonso, J.M., de Mendoza, J.H. (2005) Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet Microbiol* 110, 293-300.
- Pate , T. Švara , M. Gombač , T. Paller , M. Žolnirdovč , I. Emeršič , W.m. Prodinger , M. Bartoš , I. Zdovc , B. Krt , I. Pavlik , Ž. Cvetnić , M. Pogačnik M.ocepek . Outbreak of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in a Zoological Garden *Journal of Veterinary Medicine Series B.* Volume 53 Issue 8, Pages 387 – 392.
- Paterlini, F. (2007). SEZIONE DIAGNOSTICA PROVINCIALE DI BERGAMO. *In: [http://www.izsler.it/izs\\_bs/ftp/doc/Allegati%20IZS%20Home%20page/Rel.2007/Parte%20I/SEZ\\_BG2007.pdf](http://www.izsler.it/izs_bs/ftp/doc/Allegati%20IZS%20Home%20page/Rel.2007/Parte%20I/SEZ_BG2007.pdf)* acedido a 19/9/2009.
- Pavlik I, Dvorska L, Bartos M, Parmova I, Meliciiarek I, Jesenska A. 2002. *Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period 1965-2001 studied by spoligotyping.* *Vet Med (Praha).* 47:181-94.
- Pavlik, M. Machackova, W. Yayo Ayele, J. Lamka, I. Parmova, J. Melicharek, M. Hanzlikova, B. Körmendy, G. Nagy, Z. Cvetnic, M. Ocepek, M. Lipiec (2002). Incidence of bovine tuberculosis in wild and domestic animals other than cattle in six Central European countries during 1990-1999 *Vet. Med. Czech*, 47,(5): 122-131.
- Perea, A.; Arenas, A.; Maldonado, A.; Tarradas, C.; Gómezvillamandos (2005), Patología de los pequeños rumiantes en imágenes (II): Enfermedades de los adultos (enfermedades infecciosas). *Ciência Veterinária*, 1999. *In* : [http://www.colvet.es/infovet/oct99/ciencias\\_v/articulo1.htm](http://www.colvet.es/infovet/oct99/ciencias_v/articulo1.htm) acedido a 20/09/2005.
- Pérez, J., Granados, J., Ramón, C., Soriquer, Fandos, P., Márquez, F. e Cramp, J. (2002). Distribution, status and conservation problems of the Spanish Ibex, *Capra pyrenaica* (Mammalia: Artiodactyla) *Mammal Rev.*, Volume 32, No. 1, 26-39.
- Pignata W.A., Alves C.J., Azevedo S.S., Dantas A.F.M., Gomes A.A.B., Remígio F.R. & Lima F.S. (2009) *Prevalence for Caprine tuberculosis in paraibano semi-arid - Prevalência para tuberculose caprina no semi-árido paraibano.* *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(7):526-532.
- Pollock, J.M., Neill, S.D., (2002). Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal* 163, 659-665.
- Pollock, J.M., McNair, J., Bassett, H., Cassidy, J.P., Costello, E., Aggerbeck, H., Rosenkrands, I., Andersen, P., (2003). Specific delayedtype hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1856-1860.
- Pollock, J.; Welsh, M.; e McNair, J. (2005). Imune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control disease. *Veterinary immunology and immunopathology* 108. 37-43.
- Pritchard. G.(1988). A century of bovine tuberculosis 1888 – 1988: contest and controversy. *J.Com.Pathology*, v.99. 357-399.

- Prodinge, M., Eigentler A., Allerberfer F., Schonbauer M., Glawischning W. (2002). Infection of red deer, cattle and humans with *Mycobacterium bovis* subs. *caprae* in western Austria. *J Clinical Microbiology* 40, 2270-2272.
- Prodinge, W.M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschioli, M.L., Aranaz, A., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Skrypnik, A., Eler, W., Niemann, S., Pavlik, I., Moser, I., (2005) Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* 43, 4984-4992.
- Quinn P.; Markey B.; Carter M.; Donnelly W.; Leonard F. (2005). Género *Mycobacterium*. *Microbiología veterinária e doenças infecciosas. Capítulo 17. Editora Artmed*. 106-114.
- Quintas H, Reis J, Pires I, Alegria N. (2010). Tuberculosis in goats. *Veterinary Record*. Apr 3;166(14):437-8.
- Quintas H., Coelho, A., Valentim R., Vila Grau A., Prendes Marques S., Maurício R., Mendonça A. (2012). Poster: "Serological survey of Map infection in goats in the Northeast of Portugal". XXVII World Buiatrics Congress, Lisbon.
- Radostits, O; Gay, C.; Hinchcliff, K.; Constable, P. (2007). Tuberculosis associated with mycobacterium bovis. In *Veterinary Medicine – A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10 th edition. Saunders Elsevier*. 1007-1014.
- Ramirez, I. Santillan, M.; Dante, V. (2003). The goat as an experimental ruminant model for tuberculosis infection. *Small Ruminant Research* 47. 113–116.
- Rasgoti, N. e Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *OIE Scientific and Technical Review* 20. 21-54.
- Rastogi N, Legrand E, Sola C. (2003). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*. 2001 Apr;20(1):21-54.
- Rhodes, S.; De Leij, F.; e Dale, J. (2007). Protozoa as an environmental reservoir of bovine tuberculosis. *Trends in Microbiology* 15. 338-339.
- Ritacco V, López B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. (1991). Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. 1991 May;50(3):365-7.
- Romero, B., Aranaz, A., Juan, L., Alvarez, J., Bezos, J., Mateos, A. Gomez-Mampaso, E., Dominguez, L. (2006). Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile isolates from animals. *Journal of Clinical Microbiology* 44. 3405-3408.
- Roring S, Hughes MS, Skuce RA & Neil SD. (2000) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping *Veterinary Microbiology* Volume 74, Issue 3: 227-236
- Ruppert, E. (1992) Meat hygiene statistics 1990. *Rund Fleisch Lebens* 44 (10) 226-228.
- Ryan, T.J., Buddle, B.M., DE Lisle, G.W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Research in Veterinary Science* 69,57-61.
- Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, Ouzrout R. 2009. *Molecular characterization of Mycobacterium bovis strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria*. *BMC Vet Res*.;5:4
- Sanchez, J., Tomás, L., Buendía, A.J. Y Navarro, J.A. (2008). Avances en inmunología y métodos de diagnóstico en la tuberculosis caprina. XXXIII Jornadas Científicas y XII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. 63-73
- Sanchez, L. Tomas, N. Ortega, A. J. Buendia, L. del Rio, J. Salinas, J. Bezos, M. R. Caro e J. A. Navarro. 2011. *Microscopical and Immunological Features of Tubercloid Granulomata and Cavitary Pulmonary Tuberculosis in Naturally Infected Goats*. *J. Comp. Path.*, Vol. 145, 107e117
- Sanson, R. (1988). Tuberculosis in goats. *Surveillance* 15. 7-8
- Savov, N. (1974). Tuberculosis and mycobacterioses in farm animals. *Bulgarian academic of Sciences*.
- Scott, P.R. and Gessert, M. E. (1998) . *Ultrasonographic examination of the ovine thorax*. *Vet. J.* , 155:305-310.

- Scott, P (2009) *Thoracic ultrasonography as an adjunct to clinical examination on farm. In Practice* 31, 446-45
- Serrano, A., Marchetti, G., Sanguinetti, V., Rossi, M.C., Zanoni, R.G., Catozzi, L., Bandera, A., Dini, W., Mignone, W., Franzetti, F., Gori, A. (1999). Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2766–2771.
- Serrano, E.; Uceda, A. (2007) Hipersensibilidad. In: Manual de Inmunología Veterinaria. Coordinado por: Gómez-Lúcia; E; del Mar, M.; Doménech, A. Pearson – Prentice Hall. 565-568.
- Seva J, Hern\_andez D, Bernabe A, Pallares FJ, Navarro JA (2000). *Immunophenotypical characterization of the lymphocyte infiltrate in caprine pulmonary tuberculosis.* *Journal of Comparative Pathology*, 123. 96-103.
- Shanahan A, Good M, Duignan A, Curtin T, More SJ. 2011. *Tuberculosis in goats on a farm in Ireland: epidemiological investigation and control.* *Vet Rec.* May 7;168(18):485.
- Sharan et al. (1988). A note on tuberculosis in goats. *Indian Vet Med J.* 12. 184-186.
- Sharma, R. , Rrancis, B., Pandey, G, Chizyuka, H. (1985). Goat tuberculosis in Zambia. *Indian J. Vet Pathol.* 9. 29-32.
- Sharpe AE, Brady CP, Johnson AJ, Byrne W, Kenny K, Costello E. 2010. *Concurrent outbreak of tuberculosis and caseous lymphadenitis in a goat herd.* *Vet Rec.* May 8;166(19):591-2
- Shitaye, J., Getahun, B., Alemayehu, T. Skoric, M. Tremel, F. Fictum, P. Vrbas, V. Pavlik, I. (2006). A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS6110 PCR examination of tissues with tuberculous lesions in cattle in Ethiopia. *Veterinari Medicina*, 51,(11): 512–522.
- Shuralev, E., Quinn, P., Doyle, M., Duignan, A., Kwok, H., Olwill, S., Gormley, E., Good, M., Clarke, J., Whelan, C., 2012. *Application of the Enfer Chemiluminiscent multiplex ELISA system for the detection of Mycobacterium bovis infection in goats.* *Veterinary Microbiology.* 154: 292-297.
- Skuce R, McDowell SW, Mallon TR, Luke B, Breadon, EL, Lagan, PL, McCormick, CM, McBride SH & Pollock JM. (2005). Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs) *The Veterinary Record* 157:501.
- Smith N, Gordon SV, de la Rúa-Domenech R, Clifton-Hadley RS & Hewinson RG (2006) Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Reviews Microbiology* 4, 670-681.
- Smith M., Sherman D. (2009). Tuberculosis. *Goat Medicine* 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-Blackwell. 357-358.
- Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Loch C., Supply P. & Rastogi N. (2003). Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics *Infection, Genetics and Evolution* Volume 3, Issue 2:125-133 .
- Sousa J.; Rodrigues A.; Exposto F. (2000). *Mycobacterium*. *Microbiologia: volume 2.* Edições Lidel. 85-98.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, E., Connell, D., Kreiswirth, N., Whittam, S., Musser, J. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94. 9869-9874.
- Sintchenko V, Jelfs P, Dally M, Crighton T, Gilbert GL. 2006. *A case of urinary tuberculosis due to Mycobacterium bovis subspecies caprae.* *Pathology.* 38:376–8.
- Tato, A; Hermoso, M; Rey, J; Alonso, J; Teixido, J; Garcia, A. (1997). *Mycobacterium bovis* infections in wild and domestic animals in Caceres province (Western Spain). *Rev Esp Quimioterap* 10. 182.
- Taylor, M.G., Murphy, E., Hopkins, R., Rutland, P., Chistov, Y. (2007a). First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology* 153. 1243-1249.

- Taylor, M.G., Worth, D.R., Palmer, S., Jahans, K., Hewinson, G.R.(2007b) Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BioMed Central Veterinary Research* 3:12.
- Thoen C. E Himes, E. (1986). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* in infection. *Process in Veterinary Microbiological Immunology*, 2. 198-214.
- Thoen, C. & Barletta R. (2006). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. Chapter 4. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2<sup>nd</sup> edition. Blackwell Publishing. 18-33.
- Thoen C., Lobue P., de Kantor I. (2006) The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiology* 112. 339-345.
- Thorel, M., Gaumont, R. (1977). Contribution à l'étude des réactions sérologiques et allergiques chez la chèvre sensibilisée par des antigènes tuberculeux. *Bulletin de l'académie veterinaire de France* 50. 549-568.
- Thorel, M. (1980). Tuberculose de la chèvre: diagnostique biologique. *Ann Rech Vet* 11. 251-257.
- Thorel, M. (1984). Tuberculose de la chèvre. Mise au point et synthèse. In: *Les maladies de la Chèvre*. Les Colloques de l'INRA. 551-557.
- Tizard, I. (2009). Type IV hypersensitivity: delayed hypersensitivity. In: *Veterinary Immunology: an introduction*. 8<sup>th</sup> edition. Saunders Elsevier. 369-371.
- Tortoli E. (2006). The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Nov;48(2).159-78.
- Tratadi et al. (1976). Su di un focolaio di tubercolosi nelle capre. *Rivista di Zootecnia e Veterinaria* 2. 170-176.
- Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, Morawietz L, Roth A, Brinkmann V, Kosmiadi GA, Seiler P, Aichele P, Hahn H, Krenn V, Göbel UB, Kaufmann SH. (2005). Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. *Journal of Pathology* 205, 633-640.
- van der Zanden A, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, Nagelkerke NJD & van Soolingen D (2002). Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, No. 12:4628-4639.
- van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM & van Embden JD (1993). Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 31(8): 1987-1995.
- Vera A, Bernabé A, Gómez MA, Navarro JA, Menchen V, Sidrach J (1989). A case of tuberculosis in goat produced by *Mycobacterium tuberculosis*". *Pathologie caprine et productions*. 2eme Colloque International de Niort. Etudes et synthèses de l'EMVT 42: 311-313.
- Vicente, P. (2004). Aspectos zoonóticos de la epidemiología de la tuberculosis en España. Revisión bibliográfica. *SSAZ-DGSP-CS Región de Murcia*. 1-39.
- Vicente J, Delahay RJ, Walker N J, Cheeseman CL.(2007). Social organization and movement influence the incidence of bovine tuberculosis in an undisturbed high-density badger *Meles meles* population. *J Anim Ecol* 76: 348–360.
- Vidal, D., Domingo, M., Casal, J., Liébana, E., Aranaz, A., Domínguez, L. (1995). Erradicación de tuberculosis en rebaños caprinos mediante intradermorreacción y prueba de gamma-interferon. VII Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. León, 7 a 9 de Junio.
- Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., Cockle, P.J., Whelan, A.O., Simmons, J., Hewinson, R.G., 2002. *Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following Mycobacterium bovis BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis*. *Infect. Immun.* 70, 3026–3032.
- Wards, B.J., Collins, D.M., De Lisle, G.W. (1993). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary microbiology* 43, 227-240.
- Waters, W.R., Nonnecke, B.S., Palmer, M.V., Robbe- Austermann, S., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Whipple, D.L., Payeur, J.B., Estes, D.M., Pitzer, J.E., Minion,

- F.C.,(2004). Use of recombinante ESAT6:CFP-10 fusion differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and *M.avium* subsp *avium* and *M.avium* subsp *paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11 (4), 729-735.
- Waters, W., Palmer,M., Thacker, T., Bannantine, J., Vordermeier, H., Hewinson, R., Greenwald, esfandiari, J., McNair, J., Pollock, J., Andersen, P., Lyashchenko, P. (2006) Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 648-654.
  - Welsh, D.M., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R.M., Mcnair, J., Skuce, R.A., Bryson, D.G., Pollock, J.M. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 114, 101-111.
  - WHO (1993). Report of the who meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*). Geneva. FAO/WHO/CDS/VPH. pp.27
  - WHO (1994). Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): Memorandum from a WHO meeting (with the participation of FAO). *Bulletin of the World Health Organization* 72 (6). 851-857.
  - WHO (2007a). Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO Report 2007 WHO/HTM/TB/2007.376. World Health Organization, Geneva, Suíça. pp.277
  - WHO (2007b). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in European Union in 2006. *The EFSA Journal*. pp.130.
  - Wood P.R., Rothel, J.S.(1994). In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiolog* 40,125-135.
  - Wood PR, Corner LA, Plackett P (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for the diagnosis of bovine tuberculosis based on the production of  $\gamma$  interferon. *Res. Vet. Sci.* 49. 46-49.
  - Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, de Witte K, et al. (1992). A field evaluation of serological and cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Vet Microbiology* 31. 71-79.
  - Wood, P.R., Jones, S.L., (2001). Bovigam: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81,147-155.
  - Zanardi G, Boniotti MB, Gaffuri A, Casto B, Zanoni M, Pacciarini ML. 2013. *Tuberculosis transmission by Mycobacterium bovis in a mixed cattle and goat herd*. *Res Vet Sci*. Oct;95(2):430-3.
  - Zanella, G., Duvauchelle, A., Hars, J., Moutou, F., Boschiroli, M.L., Durand, B., (2008). Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Vet Rec* 163, 43-47.
  - Zarzuelo, E. (1981). Tuberculosis. *Patologia Infecciosa ovina. Publicaciones científicas ovejero*. 569-580.

**Legislação consultada:**

***Portuguesa e Europeia:***

- Directiva do Conselho 64/432 EEC de 26 de Junho de 1964
- Directiva 97/12/CEE do Conselho de 17 de Março
- Regulamento CE 853/2004 de 29 de Abril
- Decreto-Lei n.º 157/98 de 9 de Junho
- Decreto-Lei n.º 378/99 de 21 de Setembro
- Decreto-Lei n.º 272/2000 de 8 de Novembro;
- Regulamento (CE) nº 126/2002 da Comissão de 8 de Julho

***Espanhola:***

- Real Decreto 1328/2000 (B.O.E. 8/07/2000)
- Ordem 30/03/2005 (B.O.R.M. 11/04/1995)
- Ordem 1/7/2005 (B.O.R.M. 20/7/2005)
- Ordem 21/5/2008 (B.O.R.M. 2/6/2008),
- Ordem 13/07/2000 (B.O.R.M. 26/07/2000)

***Francesa:***

- JORF nº226 de 30 de Setembro
- Ordem 15/9/2003
- Ordem 19/8/2009

Quintas, H. "Tuberculose caprina: Estudo de dois surtos em Trás - os - Montes". Bragança, Portugal: 2013.

Trabalho apresentado ao Instituto Politécnico de Bragança para a obtenção o título de Especialista na área de Ciências Veterinárias.