

João Vítor Fernandes de Jesus

**Abates Sanitários de Tuberculose Bovina:
Um Estudo Retrospectivo (2011-2012)**

Orientador: Doutor Carlos Santos

Co-orientador: Mestre Ricardo Assunção

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

João Vítor Fernandes de Jesus

**Abates Sanitários de Tuberculose Bovina:
Um Estudo Retrospectivo (2011-2012)**

**Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Medicina Veterinária no
curso de Mestrado Integrado em Medicina
Veterinária conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias.**

Orientador: Doutor Carlos Santos

Co-orientador: Mestre Ricardo Assunção

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2013

EPÍGRAFE

A educação é a arma mais poderosa que você
pode usar para mudar o mundo.

Nelson Mandela, África do Sul 1918 / 2013

Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter;
Repugná-la-íamos se a tivéssemos.
O perfeito é desumano, porque o humano é
imperfeito.

Fernando Pessoa, Portugal 1888 / 1935

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado a todas as pessoas que ao longo destes vinte e quatro anos de vida contribuíram para a minha aprendizagem e crescimento pessoal, ajudando-me a encontrar, interpretar e apreciar toda a simplicidade da vida, tornando-me eu assim naquilo que sou hoje, um profundo apreciador das coisas simples.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos são dirigidos a todos aqueles que de forma directa ou indirecta tornaram esta dissertação de mestrado e esta minha consequente graduação académica possível. Não sendo possível mencionar todos os envolvidos neste percurso, pois seria muito extenso e correria o risco de esquecer alguém, deixo algumas palavras de apreço a pessoas com um significado especial.

Obrigado Sara por seres a pessoa que me desassossega para a urgência e importância das coisas, certamente a tua maneira de ser influenciou o meu percurso até aqui, tornando-o mais simples, organizado e fácil de percorrer. Obrigado por seres capaz de plantar no meu interior valores e sentimentos que jamais havia conhecido anteriormente e que me tornam num Ser maior e mais realizado dia após dia. Hoje sei que posso contar contigo para tudo assim como tu sabes que nunca te faltarei, somos e seremos duas metades iguais, muito frágeis por si só mas indestrutíveis quando unidas.

Um especial agradecimento à minha família por todo o investimento depositado no meu futuro e por todo o apoio demonstrado ao longo do tempo, tomando os meus interesses para si como se dos seus se tratassem. Sem vocês não teria sido possível chegar até aqui e por isso vos agradeço eternamente, sei que posso contar convosco em todo e qualquer momento.

Agradeço ao corpo de orientação que me acompanhou ao longo do período de estágio e de elaboração deste trabalho escrito. Obrigado Doutor Carlos Santos e Mestre Ricardo Assunção por terem aceitado os cargos de orientador e co-orientador respectivamente e por toda a disponibilidade demonstrada.

Um grande obrigado ao Dr. Miguel Lamela pelo acompanhamento prestado como responsável externo de estágio na Direcção de Serviços de Segurança Alimentar (DSSA) da Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). É com amizade e admiração que deixo aqui um reconhecimento ao seu trabalho, tendo feito sempre mais do que aquilo que lhe seria exigido como responsável externo. Que fique bem claro que esta dissertação tem muito do seu empenho, especialmente no que se refere à planificação e estruturação da mesma.

Quero agradecer ao Dr. Mauro Bragança pelo apoio prestado na parte estatística e de análise de dados, a sua ajuda foi muito importante para a melhoria deste trabalho.

Não posso deixar de agradecer ao Dr. Miguel Cardo e a Dra. Marta Castel-Branco que foram as pessoas responsáveis pela oportunidade de estágio que tive na Direcção de Serviços de Segurança Alimentar (DSSA). Numa altura muito complicada para mim devido a uma repentina alteração de planos de estágio e a pouco tempo deste ter início foram eles que agilizaram a minha situação e me proporcionaram uma experiência de estágio tão enriquecedora e gratificante, um grande obrigado.

Agradeço a todas as pessoas que colaboram na Direcção de Serviços de Segurança Alimentar (DSSA), foram impecavelmente acolhedores e disponíveis para ajudar em tudo aquilo que eu precisei.

Agradeço ainda a todos os veterinários inspectores e auxiliares de inspecção com quem privei nas várias semanas pelos diversos matadouros. Sempre muito bem-dispostos e sempre prontos a esclarecerem todas as dúvidas que iam aparecendo nas tarefas de inspecção.

Agradeço à Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) por me ter acolhido nas suas instalações e por ter permitido o acesso aos dados utilizados para a elaboração desta dissertação de mestrado.

Por último agradeço também à Sicasal, ao Matadouro Regional de Mafra e à Avigril por esta oportunidade de contactar com a realidade de abate e inspecção sanitária em Portugal, sem dúvida que foram semanas de grande aprendizagem.

RESUMO

A tuberculose bovina constitui um problema económico e de saúde pública relevante nos países subdesenvolvidos e apesar de actualmente os países desenvolvidos terem a doença controlada, isto só é possível devido à implementação de programas de controlo e erradicação.

Esta dissertação pretende clarificar a situação actual de Portugal face à tuberculose bovina e aos programas de controlo e erradicação implementados.

Foi elaborado um estudo estatístico com 1142 bovinos sujeitos a abate sanitário por tuberculose bovina em território português entre os anos de 2011 e 2012.

Do total de 1142 animais abatidos, 523 (45,8%) apresentaram lesões à inspecção sanitária; desses, 296 (56,6%) apresentaram lesões apenas numa determinada região anatómica e 227 (43,3%) apresentaram lesões em duas ou mais regiões anatómicas reflectindo o grau de dispersão sistémica da doença.

A média de lesões por animal foi de 2,24 lesões, sendo que este parâmetro foi inferior em animais mais jovens e superior em animais de idade mais avançada.

Os linfonodos da cabeça e do tórax foram as localizações mais frequentes. Neste estudo houve uma predominância de bovinos do sexo feminino e das raças “Cruzado de carne”, Maronesa e Mirandesa.

Palavras-chave: tuberculose bovina; abate sanitário; lesões *post mortem*

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is an economic problem and relevant public health in developing countries. Currently developed countries have controlled the disease due to the implementation of control and eradication programs.

This study aims to clarify the current situation of Portugal against bovine tuberculosis control and eradication programs and implemented.

For this purpose we designed a statistical study of a set of 1142 cattle submitted to sanitary slaughter due to bovine tuberculosis in Portuguese territory in the years 2011 and 2012.

Among the 1142 animals slaughtered, 523 (45,8 %) presented lesions at sanitary inspection; from these, 296 (56,6 %) had lesions only in a particular anatomical region and 227 (43,3 %) had lesions in two or more anatomical regions, meaning that bovine tuberculosis was already spread by the body.

The average number of lesions per animal, considering only animals that showed injuries to *post-mortem* inspection, was 2,24 , and this parameter was lower in young animals and higher in old animals.

Lesions prevailed at the lymph nodes of the head and at the thorax. In this study there was a predominance of female cattle, “Crossbreed beef”, Maronesa and Mirandesa cattle breed.

Keywords: bovine tuberculosis; sanitary slaughter; *post mortem* lesions

LISTA DE ABREVIATURAS

< Menor que

> Maior que

% Percentagem

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
CMA	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DGAV	Direcção Geral de Alimentação e Veterinária
DGV	Direcção Geral de Veterinária
DSSA	Direcção de Serviços de Segurança Alimentar
DSVR	Direcção de Serviços Veterinários Regionais
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
EFSA	European Food Safety Authority
IDTC	Intradermotuberculinização de Comparação
IE	Inquérito Epidemiológico
IFN-γ	Interferão Gama
Lnn	Linfonodos
M.	<i>Mycobacterium</i>
NCV	Número de Controlo Veterinário
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal

OPPs	Organizações de Produtores Pecuários
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Plano de Erradicação da Tuberculose Bovina
PISA	Programa Informático de Saúde Animal
PPD	Derivado Proteico Purificado
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SNIRA	Sistema Nacional de Identificação e Registo Animal
UE	União Europeia
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
X	Cruzado de
ZN	Ziehl-Neelsen

ÍNDICE GERAL

EPÍGRAFE

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

PREÂMBULO.....	15
1- INTRODUÇÃO.....	17
1.1- Enquadramento Bibliográfico da Tuberculose Bovina.....	17
1.1.1- Perspectiva histórica da tuberculose.....	17
1.1.2- Etiologia.....	18
1.1.3- Vias de infecção e transmissão da tuberculose bovina.....	23
1.1.4- Patogenia e resposta imunitária.....	24
1.1.5- Sinais clínicos e lesões	26
1.1.6- Meios de diagnóstico.....	29
1.1.7- Epidemiologia mundial.....	31
1.1.8- Epidemiologia nacional.....	33
1.1.9- Tuberculose em animais silváticos.....	34
1.2- Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina.....	35

1.3- Objectivos.....	36
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1- População em Estudo.....	38
2.2- Metodologia.....	38
2.3- Análise Estatística.....	40
3- RESULTADOS.....	42
3.1- Informação Referente à Inspeção <i>Post Mortem</i>	42
3.1.1- Número de lesões.....	42
3.1.2- Número de regiões com lesão.....	43
3.1.3- Localização das lesões.....	44
3.1.4- Localização das regiões com lesão.....	45
3.1.5- Decisão sanitária.....	50
3.2- Informação Referente aos Animais.....	51
3.2.1- Idade.....	52
3.2.2- Sexo.....	55
3.2.3- Raça.....	56
4- DISCUSSÃO.....	61
4.1- Informação Referente à Inspeção <i>Post Mortem</i>	61
4.1.1- Número de lesões.....	61
4.1.2- Número de regiões com lesão.....	62
4.1.3- Localização das lesões.....	62
4.1.4- Localização das regiões com lesão.....	63
4.1.5- Decisão sanitária.....	64
4.2- Informação Referente aos Animais.....	66
4.2.1- Idade.....	66

4.2.2- Sexo.....	67
4.2.3- Raça.....	68
5- CONCLUSÃO.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	72
APÊNDICES.....	I
Apêndice I- Tuberculose bovina: prevalência de explorações positivas e prevalência de animais positivos em Portugal de 2005 a 2012.....	I
Apêndice II - Possíveis consequências da infecção por aerossóis com <i>M. bovis</i>	II
ANEXOS.....	III
Anexo I – Mapa da distribuição da tuberculose bovina no mundo no período de Janeiro a Junho de 2012.....	III
Anexo II – Classificação actual dos países da União Europeia, Noruega e Suíça relativamente à tuberculose bovina.....	IV
Anexo III - Condições para a subida e descida de estatuto sanitário de um efectivo, de acordo com o PE.....	V
Anexo IV - Indemnização recebida pelos proprietários dos bovinos submetidos a abate sanitário.....	VI
Anexo V- Modelo de inspecção <i>post mortem</i> de abates sanitários de tuberculose bovina....	VII
Anexo VI - Critérios de decisão no acto de inspecção veterinária em abates sanitários de tuberculose bovina	VIII

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Micobactérias patogénicas para os animais e para os humanos, seus hospedeiros principais e ocasionais, e doença provocada.....	19
TABELA 2 - Região atribuída a cada localização de lesão.....	39
TABELA 3 - Distribuição da idade dos animais sujeitos a abate sanitário de tuberculose bovina, considerando-se intervalos etários de 2 anos.....	53
TABELA 4 - Distribuição das raças dos animais sujeitos a abate sanitário nos anos de 2011 e 2012 em território português.....	57
TABELA 5 – Distribuição das lesões pelas raças de animais sujeitos a abate sanitário nos anos de 2011 e 2012 em território português.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1- Número de animais abatidos e número de animais com lesões no período em análise.....	42
FIGURA 2- Distribuição do número de animais pelo número de lesões apresentadas.....	43
FIGURA 3- Número de animais e número de regiões que em simultâneo apresentaram lesões nesses animais.....	43
FIGURA 4- Distribuição do número de animais por localização das lesões apresentadas.....	44
FIGURA 5- Distribuição do número de animais por localização das regiões com lesão.....	45
FIGURA 6- Distribuição do número de animais por outras regiões com lesões para além da cabeça.....	46
FIGURA 7- Distribuição do número de animais por outras regiões com lesões para além do tórax.....	46
FIGURA 8- Distribuição do número de animais por outras regiões com lesões para além do tracto gastro-intestinal.....	47
FIGURA 9- Distribuição do número de animais por outras regiões com lesões para além do fígado e seus linfonodos.....	48
FIGURA 10- Distribuição do número de animais por outras regiões com lesões para além dos linfonodos periféricos.....	49
FIGURA 11- Distribuição do número de animais por outras regiões com lesões para além do peritoneu.....	49
FIGURA 12- Decisão sanitária em função do número de lesões.....	50
FIGUTA 13- Decisão sanitária em função do número de regiões com lesões.....	51

FIGURA 14- Distribuição do número de lesões por intervalos de idades.....	52
FIGURA 15- Distribuição do número de regiões afectadas por intervalos de idades.....	53
FIGURA 16- Gráfico de dispersão do número de lesões em função da idade com linha de tendência linear.....	54
FIGURA 17- Distribuição do sexo dos animais submetidos a abate sanitário em função do número de lesões apresentadas.....	55
FIGURA 18- Distribuição do sexo dos animais submetidos a abate sanitário em função do número de regiões com lesão.....	56
FIGURA 19 – Distribuição da raça dos animais abatidos e das lesões apresentadas na inspecção sanitária.....	59

PREÂMBULO

Durante aproximadamente 6 meses de estágio curricular estive nas instalações da Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) em Venda Nova - Amadora e posteriormente no complexo em Oeiras acompanhando o trabalho da Direcção de Serviços de Segurança Alimentar (DSSA). Desse trabalho, maioritariamente burocrático, tive oportunidade de assistir à gestão de casos críticos relacionados com diversas áreas assentes em legislação de auditorias, legislação veterinária, de alimentação e legislação fitossanitária. Estive presente durante a mais recente e extensa auditoria realizada pela European Food Safety Authority (EFSA) aos serviços de inspecção sanitária portugueses por todo o território nacional. Acompanhei as saídas dos serviços centrais da DSSA em auditoria aos estabelecimentos com Número de Controlo Veterinário (NCV). Estive presente em horário laboral na inspecção sanitária em linha de abate durante 4 semanas no matadouro de bovinos (Matadouro Regional de Mafra), durante 3 semanas no matadouro de suínos (Sicasal) e durante 1 semana no matadouro de aves (Avigril).

No decorrer do período de estágio desenvolvi um interesse particular pelos programas veterinários de sanidade animal em especial pelo Programa Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina sobre o qual elaborei a presente dissertação de mestrado.

A tuberculose bovina é uma doença com distribuição mundial causada pela infecção por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Esta apresenta uma evolução de carácter crónico, com o desenvolvimento de lesões granulomatosas típicas. Atinge principalmente os bovinos mas também se pode encontrar em outras espécies domésticas, silváticas e mesmo no próprio Homem (Radostits *et al.*, 2000).

Devido às suas implicações zoonóticas e ao impacto económico que causa devido à sua natureza crónica progressiva e ao entrave na movimentação de animais, programas de erradicação da doença têm sido introduzidos em vários países. No entanto, a presença de reservatórios de *M. bovis* na vida selvagem torna a erradicação desta doença difícil de alcançar. Quando os programas de erradicação têm sucesso, são referidos casos esporádicos de bovinos infectados por agentes do complexo *M. avium*. Também se encontram descritos

casos raros de infecção cruzada de bovinos com *M. tuberculosis* a partir de humanos infectados (Quinn *et al.*, 2011).

A incidência de humanos infectados por *M. bovis* tem sido reduzida a níveis residuais em países onde foram aplicados programas de erradicação da tuberculose bovina, tendo sido confirmado o agente em 132 casos na União Europeia (UE) no ano de 2011. A pasteurização do leite contribuiu também para a redução da exposição dos humanos à infecção através da ingestão de produtos lácteos (EFSA, 2013; Quinn *et al.*, 2011).

Em Portugal a erradicação desta doença ainda não foi atingida representando elevados custos para o país. Graças às campanhas de testagem e abate dos animais positivos implementadas sistematicamente desde os finais da década de 80, Portugal encontra-se numa fase de pré-erradicação da tuberculose bovina (DGAV, 2012a).

Existem ainda zonas problemáticas de tuberculose bovina no país, sendo estas zonas quase invariavelmente zonas de caça maior, e onde a tuberculose está presente não só nas explorações mas também nas espécies silváticas como os veados e javalis (DGAV, 2011).

A região do Algarve é a única região reconhecida pela comissão europeia como oficialmente indemne de tuberculose bovina através da Decisão da Comissão n.º 2012/204/UE de 19 de Abril de 2012 (DGAV, 2012b).

1-INTRODUÇÃO

1.1- Enquadramento Bibliográfico da Tuberculose Bovina

1.1.1- Perspectiva histórica da tuberculose

Alguns manuscritos datados com o ano 2000 a.C. relatam a ocorrência da tuberculose em humanos na região da Índia (Hubbert *et al.*, 1975). No entanto, através de metodologias moleculares, foi recentemente evidenciada a presença de um agente da tuberculose numa espécie de bisonte já extinta e que se estima ter existido à cerca de 17800 anos atrás (Rothschild *et al.*, 2001), demonstrando assim o vasto passado desta doença.

Os Gregos e os Romanos foram os primeiros a reconhecer a Tuberculose como sendo uma perigosa epidemia, e Hipócrates foi o primeiro a fazer uma descrição clínica da doença. A palavra tubérculo significa nódulo e tem a sua origem no século XVII por Sylvius (Hubbert *et al.*, 1975; Ferreira & Ferreira, 1990).

Acredita-se que a tuberculose nos animais tenha surgido anteriormente à tuberculose no Homem, pois este possui um processo evolutivo muito curto, daí que se pense que tenha adquirido o agente através de outros coabitantes mamíferos, quer pelo contacto directo quer pela ingestão de carne ou produtos de origem animal infectados (Hubbert *et al.*, 1975).

Na Idade Média surgem na Alemanha algumas leis que proíbem a venda de carne de animais com doença perlácea, ou seja, tuberculose das membranas serosas. As trocas comerciais e o movimento de gado para a Europa Ocidental ajudaram a propagar a infecção que, no século XIII foi reportada pela primeira vez na Holanda. No século XVII e através de trocas comerciais de gado deste país, o agente da tuberculose atinge a Inglaterra. As raças bovinas Europeias foram exportadas para a América do Norte pelas colónias Inglesas e Francesas, sendo que no século XIX a tuberculose já era uma doença tão prevalente nos Estados Unidos da América (EUA) que a consideravam como sendo a afecção bovina mais severa (Hubbert *et al.*, 1975).

Antes da tuberculose ser uma doença reconhecida e perfeitamente identificada, a maioria das pessoas não julgavam que um único agente pudesse causar uma variedade de lesões e sintomas no homem e nos animais tais como, a tuberculose miliar, pneumonia caseosa, tuberculose dos linfonodos, *lupus vulgaris* no Homem e mastite tuberculosa nas

vacas. As lesões tuberculosas eram muitas vezes diagnosticadas como abscessos, granulomas, sarcomas e sífilis (Hubbert *et al.*, 1975; Ferreira & Ferreira, 1990).

Em 1819, Laennec descreveu pela primeira vez lesões foliculares e infiltrativas, reconhecendo assim o tipo produtivo e o tipo exsudativo da tuberculose. Mais tarde em 1868, Villemin provou que a tuberculose é uma doença infecciosa, reproduzindo a doença em coelhos injectados com material tuberculoso proveniente de humanos e de bovinos. Em Março de 1882 em Berlim, Robert Koch anunciou a descoberta do bacilo da tuberculose humana, agora chamado *M. tuberculosis*, e dois anos mais tarde teve sucesso ao conseguir a multiplicação do microrganismo. Em 1891, Robert Koch desenvolve a tuberculina, supostamente com valor curativo mas que se veio a demonstrar como uma óptima ferramenta de diagnóstico para a detecção da doença (Tizard, 2002; Coetzer & Tustin, 2004). Entre os anos de 1896 e 1898, Klein e Gibbs descobriram que o bacilo da tuberculose dos bovinos, hoje denominado *M. bovis*, era diferente do bacilo da tuberculose dos humanos em termos de características morfológicas, propriedades patogénicas e especificidades de cultivo microbiológico. No ano de 1892, o bacilo da tuberculose aviária, hoje designado *M. avium*, foi identificado por Maffucci (Hubbert *et al.*, 1975).

As três espécies de tuberculose referidas anteriormente foram reconhecidas como tal depois da Conferência Internacional da Tuberculose que aconteceu em Londres no ano de 1901. Contudo, a controvérsia entre alguns cientistas em relação ao perigo da tuberculose bovina para o Homem motivou os Ingleses e os Alemães a realizarem estudos científicos mais aprofundados e finalmente no ano de 1911 vinham a público provas claras de que o *M. bovis* podia causar todos os tipos de tuberculose no Homem, e que uma notável quantidade de casos de doença, principalmente em crianças, era devida a ingestão de leite infectado. Enquanto o perigo da ingestão de produtos alimentares contaminados era reconhecido, a transmissão aerógena do agente só no ano de 1937 foi tida em conta, quando se mostrou que a inalação de *M. bovis* nos estábulos podia provocar tuberculose pulmonar com a mesma frequência que a inalação de *M. tuberculosis* provocava (Hubbert *et al.*, 1975).

1.1.2- Etiologia

A tuberculose bovina é causada pelo agente *M. bovis*, uma espécie pertencente ao grupo das micobactérias. As espécies mais susceptíveis de infecção são os bovinos, caprinos e suínos. Os equinos e os ovinos têm uma alta resistência natural à doença, apesar de todas as

espécies, incluindo o Homem, serem passíveis de contrair infecção por este agente (Ferreira & Ferreira, 1990; Radostits *et al.*, 2000).

As micobactérias são bactérias aeróbias estritas, não produtoras de esporos, não móveis e com a forma de bastonetes que podem ter dimensões variadas consoante a sua espécie. No caso de *M. bovis* e de *M. avium* sub-espécie *avium*, apresentam-se com uma forma delgada e podem atingir 4µm de comprimento, enquanto que *M. avium* sub-espécie *paratuberculosis* são largos e normalmente com comprimento inferior a 2µm (Quinn *et al.*, 2011).

Apesar das micobactérias serem do ponto de vista citoquímico Gram positivas, a forte componente lipídica e de ácidos micólicos da sua parede celular dificulta a fixação dos corantes empregues na coloração de Gram. Preferencialmente utiliza-se a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) pois os lípidos da parede celular retêm a fucsina (corante magenta), a qual não é removida pela solução descolorante álcool-ácido posteriormente aplicada na mesma técnica. Por esse motivo, bacilos que corem de vermelho ou magenta através desta técnica de coloração são denominados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Quinn *et al.*, 2011).

As propriedades únicas da parede celular destas bactérias justificam a resistência à maior parte dos desinfetantes, ácidos e dessecação, assim como o seu crescimento lento e as suas características hidrofóbicas em meios líquidos. Quando se pretende o isolamento dos agentes, a resistência conferida pelo alto teor lipídico das suas paredes celulares permite o tratamento das amostras com substâncias ácidas ou alcalinas de modo a destruir os contaminantes, sem que quantidades significativas de micobactérias sejam também eliminadas (Ferreira & Ferreira, 1990; Coetzer & Tustin, 2004).

O grupo das micobactérias inclui uma grande variedade de espécies, abrangendo desde bactérias saprófitas ambientais e patogénicas oportunistas a agentes patogénicos obrigatórios. Apesar das micobactérias patogénicas exibirem hospedeiros preferenciais, podem ocasionalmente infectar outras espécies. Existe um conjunto de micobactérias muito semelhantes entre si e que provocam alterações patológicas semelhantes numa diversidade de hospedeiros; a este conjunto chama-se Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), no qual se engloba o agente da tuberculose bovina e cujas espécies são resumidas na Tabela 1 (Quinn *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Micobactérias patogénicas para os animais e humanos, seus hospedeiros principais e ocasionais, e doença provocada. Adaptado de Quinn *et al.*, 2011.

Espécie	Hospedeiros principais	Espécies afectadas ocasionalmente	Doença provocada
Complexo <i>M. tuberculosis</i>			
<i>M. tuberculosis</i>	Humanos, primatas de cativeiro	Cães, bovinos, psitacídeos, canários	Tuberculose (distribuição mundial)
<i>M. bovis</i>	Bovinos	Veados, texugos, possums, humanos, gatos, outros mamíferos	Tuberculose
<i>M. africanum</i>	Humanos	-	Tuberculose (principalmente África Ocidental)
<i>M. canettii</i>	Humanos	-	Tuberculose (principalmente África Oriental)
<i>M. microti</i>	Ratazanas	Ocasionalmente outros mamíferos	Tuberculose
<i>M. caprae</i>	Caprinos	Bovinos	Tuberculose
<i>M. pinnipedii</i>	Focas, Leões-marinhos	Ocasionalmente outros mamíferos incluindo humanos	Tuberculose
Complexo <i>M. avium</i>	Maior parte das aves, excepto psitacídeos	Suínos, bovinos	Tuberculose
<i>M. marinum</i>	Peixes	Humanos, mamíferos aquáticos, anfíbios	Tuberculose
<i>M. ulcerans</i>	Humanos	Coalas, possums	Úlcera de Buruli

<i>M. leprae</i>	Humanos	Armadillos, chimpanzés	Lepra
<i>M. lepraemurium</i>	Ratos, camundongos	Gatos	Lepra em ratos, lepra em gatos
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Bovinos, ovinos, caprinos, veados	Outros ruminantes	Paratuberculose (Doença de Johne's)
BAAR inespecíficos	Bovinos	-	Associados a tuberculose da pele
<i>M. senegalense</i> , <i>M. farcinogenes</i>	Bovinos	-	Implicado no “bovine farcy”

As micobactérias do CMT diferem essencialmente em termos de fenótipo e de tropismo por determinado hospedeiro. No entanto, são homólogas em 99,9% do seu ácido desoxirribonucleico (ADN) e idênticas no gene de 16S Ácido Ribonucleico Ribossomal (rRNA), daí existirem autores que defendem que os membros do CMT são ecótipos de uma mesma espécie adaptados a diferentes hospedeiros (Coetzer & Tustin, 2004).

Enquanto a coloração de ZN é utilizada para diferenciar as micobactérias de outras bactérias, a diferenciação das micobactérias patogénicas assenta nas características que evidenciam em cultura, nomeadamente através de testes bioquímicos, da inoculação em animais e em análises cromatográficas. As técnicas moleculares são cada vez mais utilizadas para identificação dos diferentes isolados. As micobactérias associadas a infecções oportunistas podem ser diferenciadas tendo em conta a sua pigmentação, a taxa de crescimento e a temperatura de incubação óptima (Quinn *et al.*, 2011).

As metodologias de trabalho com materiais biológicos contendo micobactérias proveniente de animais implicam o cumprimento de medidas de segurança biológica, dado o seu carácter zoonótico. Assim, os procedimentos devem ser realizados em laboratórios de segurança biológica de nível 3, e toda a manipulação deve ser feita através do uso de uma cabine de perigo biológico (Quinn *et al.*, 2011).

As micobactérias patogénicas apresentam crescimento lento em meios sólidos e as colónias não se tornam evidentes antes das 3 a 6 semanas de incubação. Contrariamente, as colónias das bactérias saprófitas com crescimento rápido são visíveis em poucos dias. Actualmente, estão disponíveis comercialmente sistemas de cultura líquidos, como é o caso do BACTEC™ (Becton Dickinson and Company, USA) que apresentam melhores tempos de

isolamento para as micobactérias patogénicas, rondando aproximadamente os 10 a 20 dias (Quinn *et al.*, 2011).

Em termos de características de cultura as espécies de micobactérias patogénicas podem ser distinguidas pela aparência das suas colónias em meios à base de ovo, bem como pela influência de glicerol e de piruvato de sódio na sua taxa de crescimento. O *M. avium* subsp. *paratuberculosis* requer a suplementação do meio de cultura com micobactina para que o seu crescimento seja bem sucedido. A diferenciação bioquímica contribui para a identificação de *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium*. No entanto, certos isolados apresentam painéis bioquímicos de difícil interpretação, o que dificulta a identificação da espécie através destas metodologias. A análise cromatográfica da composição lipídica de algumas espécies de micobactérias é realizada em laboratórios especializados e pode servir de complemento para a identificação da espécie (Quinn *et al.*, 2011).

As micobactérias oportunistas ou não tuberculosas são habitualmente classificadas de acordo com a sua foto-reactividade e produção de pigmento em: não cromogéneas, caso produzam colónias desprovidas de pigmentação, fotocromogéneas, quando são cultivadas no escuro produzindo colónias não pigmentadas mas que se tornam pigmentadas depois de expostas à luz, e escotocromogéneas, caso produzam pigmento quer sejam cultivadas na presença ou ausência de luz (Quinn *et al.*, 2011).

Tendo em conta as diversas técnicas moleculares, existem disponíveis comercialmente testes de ADN, complementares às sequências de rRNA espécie-específicas para o CMT, o Complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e o *M. kansasii*. As técnicas de amplificação dos ácidos nucleicos, incluindo a Polymerase Chain Reaction (PCR), são métodos rápidos e sensíveis para a detecção de micobactérias em amostras biológicas (Quinn *et al.*, 2011).

As técnicas de tipificação baseada no ADN são utilizadas em estudos epidemiológicos. A técnica de spoligotyping, a qual identifica os polimorfismos nas unidades espaçadoras nas regiões de repetição directa dos cromossomas, é a mais utilizada em estudos do *M. bovis*. Esta técnica, em conjunto com a técnica Variable Number Tandem Repeat (VNTR) constituem as técnicas com resultados mais satisfatórios no estudo epidemiológico de estirpes de *M. bovis*. Já a tipificação de estirpes de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* é frequentemente realizada pela técnica Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Quinn *et al.*, 2011).

1.1.3- Vias de infecção e transmissão da tuberculose bovina

A principal fonte de infecção nos bovinos ocorre pelo contacto com outros bovinos infectados. Os microrganismos são excretados no ar expirado, na expectoração, nas fezes, no leite, na urina, nas descargas uterinas e vaginais e nas descargas dos linfonodos periféricos que possam eventualmente atingir o exterior. Os animais com lesões severas que comuniquem com as vias respiratórias, com a pele ou com a mucosa intestinal são obviamente disseminadores da infecção. Na fase inicial da doença, antes de qualquer sinal visível, os bovinos podem excretar microrganismos viáveis no muco nasal e traqueal. Em bovinos experimentalmente infectados a excreção do agente começou 90 dias após a infecção (Radostits *et al.*, 2000; Alfonso, 2007).

Frequentemente a fauna silvestre actua como hospedeiro de manutenção do agente, o que tem prejudicado a erradicação da tuberculose bovina em alguns países, por exemplo, em certas áreas de Inglaterra e da Irlanda, os texugos (*Meles meles*) infectados têm um papel relevante na epidemiologia da tuberculose dos bovinos pois acredita-se que os bovinos contraem infecção nos pastos contaminados com urina dos texugos infectados. O possum (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia e o búfalo africano (*Syncerus caffer*) em África também são exemplos comprovados de hospedeiros de manutenção da tuberculose bovina (Radostits *et al.*, 2000; Corner, 2006; Quinn *et al.*, 2011).

A porta de entrada do agente é quase invariavelmente a inalação, seja em animais estabulados ou em animais a campo. A infecção por ingestão é possível no pasto quando as ervas e a água corrente estão contaminados mas é necessária uma dose infectante elevada. Estudos experimentais demonstram que a infecção dos bovinos por aerossóis requer cerca de 10 células bacterianas enquanto a infecção por via oral requer cerca de 10^7 microrganismos (Quinn *et al.*, 2011).

A sobrevivência do organismo no ambiente é influenciada pela temperatura, humidade, exposição ao efeito de dessecação da luz solar e da radiação ultravioleta.

O agente em si é moderadamente resistente ao calor, a desinfetantes e ao efeito de dessecação, no entanto morre imediatamente caso exposto à luz solar, a não ser que esteja num ambiente húmido. Em ambientes quentes e húmidos, e com protecção da luz solar, o agente pode permanecer viável durante algumas semanas (Radostits *et al.*, 2000).

A ingestão de leite infectado pelos animais jovens é considerada uma via comum de transmissão em países onde a doença é endémica, mas as infecções mamárias ocorrem em fases tardias da doença e são menos comuns em países com programas de controlo avançados (Alfonso, 2007). Outras vias menos comuns são por exemplo a infecção intra-uterina aquando do coito, o uso de sémen infectado ou de material de inseminação infectado, como as pipetas de inseminação utilizadas em diferentes animais. No passado, a inclusão de carcaças de bovinos tuberculosos na alimentação de suínos foi associada a um grave surto de doença (Radostits *et al.*, 2000). Outras vias de infecção, consideradas raras, relacionam-se, por exemplo, com gatos infectados, cabras ou o próprio Homem, encontrando-se descrito casos em que homens com infecção génito-urinária foram a fonte de infecção para bovinos devido ao simples facto de urinarem no meio ambiente (Radostits *et al.*, 2000).

Em termos de factores de risco e especificamente no que diz respeito ao ambiente, o alojamento em estábulo e sem acesso a zona de pasto predispõem à doença, uma vez que quanto mais os animais contactarem entre si, maior a probabilidade da doença se transmitir. Apesar disto, existem descritos casos de explorações extensivas em que verificaram morbilidades de 70% (Radostits *et al.*, 2000).

Em relação aos factores de risco do hospedeiro acredita-se que os bovinos Zebu (*Bos indicus*) são mais resistentes que as raças de bovinos Europeias (*Bos taurus*) e que o efeito da doença é menos severo (Radostits *et al.*, 2000).

1.1.4- Patogenia e resposta imunitária

Quando um animal é infectado por *Mycobacteria*, ocorre uma resposta imunológica de hipersensibilidade tipo IV (hipersensibilidade retardada). Esta situação verifica-se porque a resposta do hospedeiro ao microrganismo patogénico é essencialmente do tipo celular, pela activação do sistema mononuclear fagocitário, não estando dependente da formação de anticorpos (Snyder, 2007). As células apresentadoras de antígenos demonstram uma grande dificuldade em destruir e dar a conhecer aos linfócitos T as micobactérias; esta dificuldade advém da capacidade que as micobactérias têm em sobreviver no interior das células fagocitárias (Tizard, 2002; Paulw, 2007). Devido à presença de sulfolípidos na membrana celular bacteriana, a fusão do fagossoma com o lisossoma não é realizada e as micobactérias não são devidamente destruídas, acabando mesmo por se libertar e migrar pela corrente sanguínea transportadas por outras células fagocitárias sanguíneas, como é o caso dos

monócitos, até se alojarem em outros tecidos, órgãos e/ou linfonodos (Biberstein & Hirsh, 2004; Olson *et al.*, 2010). Apesar desta ineficácia em conter e destruir o invasor, algumas células apresentadoras de antígenos conseguem sensibilizar os linfócitos T CD4 e T CD8 (Paulw, 2007). Os linfócitos T CD4 activos libertam citocinas promotoras da inflamação como o factor de necrose tumoral, interferão- γ (IFN- γ) e interleucina-2, linfotactina, factores quimiotáxicos para macrófagos e basófilos, desenvolvendo assim uma reacção de inflamação crónica, enquanto que os linfócitos CD8 (citotóxicos) destroem os tecidos infectados circundantes levando à formação de granulomas frequentemente necrosados no seu interior (Tizard, 2002)

Quanto à propagação da tuberculose, esta ocorre em duas fases, o complexo primário e a disseminação pós-primária. O complexo primário consiste na lesão no local de entrada e no linfonodo local associado. O complexo primário denomina-se completo, caso possua lesão nos dois locais e incompleto caso apenas tenha lesão no linfonodo regional do local onde ocorreu a infecção. Uma lesão no local de entrada é frequente quando a via de infecção é por inalação. Quando a infecção ocorre pelo tracto gastrointestinal é raro provocar lesão no local de entrada, sendo mais frequente o aparecimento de lesões nos linfonodos mesentéricos ou nos linfonodos retrofaríngeos; no entanto, está descrito que podem ocorrer úlceras intestinais ou ao nível das tonsilas (Radostits *et al.*, 2000; Neill *et al.*, 2001; Coetzer & Tustin, 2004).

Cerca de oito dias após a entrada das bactérias começa a formar-se um foco primário de lesão e aproximadamente duas semanas depois inicia-se a calcificação da mesma. O foco primário de lesão, ou tubérculo, consiste no típico granuloma contendo um núcleo central de tecido caseoso necrótico, parte do qual rapidamente entra em calcificação distrófica. Esta massa central é envolvida por células epiteliais, por células gigantes de Langhans, e mais perifericamente por linfócitos, macrófagos e vários graus de fibroplasia; a encapsulação pode ser completa ou incompleta. As bactérias passam deste foco primário, o qual nos bovinos é cerca de 95% das vezes localizado no tracto respiratório, para o linfonodo regional e repetem o mesmo processo neste último até à formação do dito tubérculo (Apêndice II). Nos bovinos verifica-se que as lesões ao nível dos pulmões são, em 90% dos casos, nos lobos caudais. Em vitelos alimentados com leite infectado, o foco primário é tipicamente nos linfonodos retrofaríngeos ou mesentérico, sendo as lesões hepáticas a principal manifestação de disseminação pós-primária (Radostits *et al.*, 2000; Coetzer & Tustin, 2004; Alfonso, 2007).

As lesões primárias pulmonares podem ser muito pequenas e serem facilmente negligenciadas. Elas localizam-se principalmente caudo-dorsalmente e a nível sub-pleural,

mas podem encontrar-se em qualquer lobo e detectam-se à necrópsia ou à inspecção sanitária com maior sucesso por palpação dos pulmões. Inicialmente as lesões parecem parcialmente ou totalmente encapsuladas, com focos amarelados de necrose caseosa, podendo estar parte destes calcificados. A encapsulação não é sempre absoluta, o que permite a dispersão local pelas vias aéreas. Caso não ocorra calcificação e encapsulação atempada destes focos, a sua coalescência e expansão resulta no desenvolvimento de vastas áreas de broncopneumonia. A ulceração brônquica e traqueal também pode resultar em dispersão intrapulmonar. As lesões pulmonares podem desaparecer por completo mas as lesões metastáticas que estão invariavelmente nos linfonodos regionais persistem (Coetzer & Tustin, 2004; Pires *et al.* 2004; Alfonso, 2007).

Na pleura e no mesentério a disseminação é ajudada pela respiração e pelos movimentos peristálticos respectivamente, causando lesões caseosas nodulares difusas, salientes, em forma de placas ou agrupadas, que após calcificação são denominadas como “TB- pearls”, ou em português tuberculose perlácea (Alfonso, 2007).

A disseminação pós-primária a partir do complexo primário pode ser sob a forma de tuberculose miliar aguda, lesões nodulares em vários órgãos, ou tuberculose crónica causada pela reinfeção endógena ou exógena de tecidos sensíveis à tuberculoproteína. Neste último caso, pode não haver reacção ganglionar no linfonodo local. Dependendo da localização da infecção os sinais clínicos podem variar mas devido ao facto da doença ser progressiva, existe sempre a subjacente toxémia que causa debilitação, fraqueza e a eventual morte do animal. Num ensaio experimental em que se injectou *M. tuberculosis* endovenoso em bovinos, as reacções foram tão diversas resultando em respostas desde pneumonia tuberculosa aguda a tuberculose progressiva generalizada crónica (Radostits *et al.*, 2000).

1.1.5- Sinais clínicos e lesões

A tuberculose bovina tem geralmente um decurso crónico e sub-clínico, demorando a maior parte das vezes meses ou mesmo anos até que surjam os primeiros sinais. Na maior parte dos animais a doença é inaparente, sendo apenas detectada pela aplicação do teste da tuberculina. Em casos de sintomatologia evidente, esta depende do órgão ou sistemas envolvidos e da severidade da infecção (Tizard, 2002; Coetzer & Tustin, 2004).

Dada a complexa natureza da doença, as manifestações clínicas e patológicas podem variar substancialmente, e as diferentes medidas de controlo aplicadas pelos diversos países

também condicionam os quadros clínicos que aparecem. Por exemplo, em países onde existem medidas activas e agressivas de controlo da doença, as manifestações são na maior parte dos casos respiratórias e a sua extensão é limitada. Já nos países onde a doença não é activamente controlada, os casos de doença com disseminação sistémica são frequentes (Coetzer & Tustin, 2004; Alfonso, 2007).

A doença tem um desenvolvimento muito variável, podendo ocorrer casos de remissão, de recidiva e mais raramente de aprisionamento da infecção e auto cura. A tuberculose nos linfonodos e nos pulmões são as formas mais comuns em bovinos, sendo considerada rara a tuberculose a nível renal, hepático, esplénico, ósseo, articular, mamário e reprodutor, sendo usualmente causada por disseminação hematogénea (Coetzer & Tustin, 2004).

Devido ao facto da maior parte das infecções ocorrerem por inalação e ingestão, os tubérculos ocorrem predominantemente nos linfonodos retrofaríngeo, brônquico, mediastínico e mesentérico (Coetzer & Tustin, 2004; Alfonso, 2007). A presença de lesões nestes locais segue o padrão típico dos animais de países onde a doença é activamente controlada, como é o caso de Portugal (Coetzer & Tustin, 2004; Alfonso, 2007; DGAV, 2012a). Em países onde o controlo é mais reduzido ou inexistente, a distribuição das lesões vai ao encontro daquilo que se encontra descrito a seguir. Em bovinos adultos e vitelos já com idade avançada os pulmões estão afectados em cerca de 90 a 95% dos casos, enquanto o tracto digestivo está infectado em 5 a 10% dos casos. Em vitelos de tenra idade infectados através do cordão umbilical, 49% dos casos desenvolvem lesões hepáticas, 38% desenvolvem lesões pulmonares e 13% dos casos resultam em lesões do tracto gastrointestinal (Coetzer & Tustin, 2004).

A existência de lesões características num determinado órgão sugere a ocorrência de tuberculose nesse animal, no entanto, alguns sinais clínicos gerais também podem ajudar no diagnóstico. Alguns bovinos com extensas lesões de tuberculose miliar estão clinicamente estáveis mas na maioria dos casos apresentam uma emaciação progressiva isolada de qualquer outro sinal, e isto, deve ser sempre considerado como uma suspeita de tuberculose. Sinais como apetite caprichoso, temperatura rectal flutuante e pelagem em mau estado também estão comumente associados a doença. Os animais infectados tendem a ficar mais dóceis mas os seus olhos mantêm-se brilhantes e alerta. Estes sinais tornam-se principalmente evidentes em períodos de stress como no período pós-parto ou em casos de subnutrição (Radostits *et al.*, 2000; Coetzer & Tustin, 2004). Quando o sistema pulmonar é o sistema mais afectado pela doença, os animais apresentam tosse crónica como consequência da broncopneumonia

associada. A tosse nunca é exuberante ou paroxística, ocorrendo apenas um ou dois actos de cada vez e sendo suave, suprimida e produtiva. É facilmente estimulável massajando a faringe ou com o aumento da actividade física e na maior parte das vezes acontece de manhã ou está normalmente associada a temperaturas baixas. Em estados mais graves quando muito tecido pulmonar está envolvido, o animal apresenta dispneia com aumento da profundidade e do número de ciclos por unidade de tempo. Nesta altura é possível identificar alterações aquando da auscultação e percussão do tórax, como por exemplo, áreas com ausência de som respiratório associadas a áreas onde se identificam crepitações bastante audíveis, principalmente nos lobos caudais. Por vezes pode ocorrer pleurisia mas esta é muitas vezes assintomática pois não é acompanhada de efusão. O envolvimento dos linfonodos brônquicos pode provocar dispneia devido ao efeito de constrição que provoca nas vias respiratórias e o aumento dos linfonodos mediastínicos está frequentemente associado a timpanismos ruminais recorrentes, que mais tarde se tornam persistentes (Radostits *et al.*, 2000; Alfonso, 2007).

Ao nível do tracto gastrointestinal, a ocorrência de diarreia como consequência de úlceras intestinais é rara. As lesões nos linfonodos retrofaríngeos provocam disfagia e respiração ruidosa devido à obstrução provocada na faringe e laringe. A palpação ou a endoscopia faríngea podem revelar estruturas de tamanho aumentado e consistência firme na faringe. A linfadenomegália crónica mandibular, pré-escapular, pré-crural e supra-mamária também pode ocorrer mas de modo menos frequente e não doloroso (Radostits *et al.*, 2000).

No que respeita ao aparelho reprodutor, a tuberculose uterina é pouco comum e mais prevalente em estados de disseminação sistémica da doença. A sua propagação por contiguidade de tecidos pode provocar peritonite, bursite e salpingite, sendo estas lesões ao nível dos ovários caracterizadas por um pequeno aumento dos mesmos e pela presença de um fluido amarelo no seu interior. Em caso de metrite por tuberculose pode ocorrer infertilidade e caso haja concepção, ou acontece aborto recorrente no final da gestação ou o vitelo nasce mas acaba por morrer nos primeiros dias por tuberculose generalizada. As lesões na placenta assemelham-se às lesões que ocorrem em casos de brucelose. Nas vacas que não ficam gestantes pode ser identificável um corrimento purulento crónico a nível vulvar, e esta condição é normalmente muito resistente ao tratamento. Nos machos são raros os casos de orquite por tuberculose e caracterizam-se por aumento e endurecimento testicular não doloroso (Radostits *et al.*, 2000).

Uma vez que podem afectar a saúde pública, as lesões de tuberculose ao nível do aparelho mamário constituem uma elevada preocupação. Estas perpetuam a transmissão da

doença aos vitelos e são difíceis de diferenciar de outras mastites. A sua característica mais marcante é o endurecimento e hipertrofia da glândula mamária, normalmente na parte superior do úbere e principalmente nos quartos traseiros. A palpação dos linfonodos supra-mamários é fundamental para avaliar todos os animais suspeitos de mastite por tuberculose. Nas fases iniciais, o leite tem aparência normal macroscopicamente mas mais tarde uns finos flóculos acabam por aparecer e precipitar, tornando o leite num fluido claro de cor âmbar. Em estadios avançados a secreção mamária pode já ser apenas constituída por este fluido (Radostits *et al.*, 2000).

1.1.6- Meios de diagnóstico de tuberculose bovina

O diagnóstico *in vivo* da tuberculose bovina consiste principalmente em ensaios de imunodiagnóstico, uma vez que têm a capacidade de detectar animais infectados em fases iniciais da doença (Tizard, 2002; Rua-Domenech *et al.*, 2006; Quinn *et al.*, 2011).

Seguindo a legislação europeia e as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), o teste de rastreio utilizado consiste na injeção intradérmica de tuberculina e posterior detecção da reacção de hipersensibilidade do tipo IV, que se manifesta através do espessamento da pele no local de inoculação. A tuberculina utilizada é um derivado proteico purificado (PPD) obtido laboratorialmente a partir do crescimento e tratamento térmico de determinadas micobactérias. A reactividade nos bovinos é normalmente detectada entre 30 a 50 dias pós-infecção (Tizard, 2002; Rua-Domenech *et al.*, 2006; Paul, 2007; Quinn *et al.*, 2011). Existem dois métodos possíveis, o teste intradérmico simples e o teste intradérmico comparado. No teste simples administra-se PPD bovina (obtida de uma estirpe de *M. bovis*) a nível intradérmico na prega da cauda e o local de injeção é examinado 72 horas após inoculação, sendo uma reacção positiva caracterizada por um exuberante ou edematoso inchaço. No teste intradérmico comparado utiliza-se tuberculina bovina e tuberculina aviária (obtida de uma estirpe de *M. avium* subsp. *avium*). Esta prova consiste em administrar as duas tuberculinas na tábua do pescoço, atendendo a que é um local mais limpo e mais sensível, separadas por cerca de 12 cm e com prévia tricotomia do local de injeção. A espessura da pele é medida antes da injeção e 72 horas após a mesma. Consideram-se positivos os animais que produzam um aumento da espessura da pele no local de administração da tuberculina bovina, no mínimo, superior em 4 mm relativamente ao aumento produzido na zona de injeção da tuberculina aviária (Tizard, 2002; Rua-Domenech *et al.*,

2006;Quinn *et al.*, 2011). Em ambos os testes podem verificar-se resultados falsos, sejam falsos positivos ou falsos negativos. Os falsos positivos podem ser atribuídos à sensibilidade a outras micobactérias que não *M. bovis*. Em países que utilizem o teste simples e onde a proporção de reacções falsas positivas seja alta o teste comparado pode ser uma boa solução. As causas mais comuns para resultados falsos negativos são animais infectados recentemente e que ainda não desenvolvam a reacção de hipersensibilidade, uma vez que esta só ocorre cerca de 30 dias após infecção. A imunossupressão devida ao stress, incluindo a que ocorre frequentemente no período pós-parto, ou a administração de fármacos imunossupressores podem contribuir para a incapacidade do animal testado responder ao teste. São reconhecidos casos de animais que apresentam tuberculose avançada e que são caracterizados por um estado não responsivo, referido na literatura como anérgico; os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente entendidos. Também está descrita uma dessensibilização transitória após administração de tuberculina, mas normalmente a reactividade volta no prazo médio de 60 dias (Tizard, 2002; Rua-Domenech *et al.*, 2006;Quinn *et al.*, 2011).

Alguns testes sanguíneos foram desenvolvidos para serem utilizados em conjunto com o teste da tuberculina, nomeadamente o IFN- γ . Este teste identifica animais infectados em estadios mais precoces que o teste da tuberculina e está aprovado como teste suplementar para bovinos na Europa, nos EUA e Nova Zelândia. É frequentemente utilizado em conjunto com a tuberculinização em explorações permanentemente infectadas ou em explorações com elevado número de casos positivos. Este teste é uma prova *in vitro* baseada numa resposta imunitária do tipo celular, ou seja, na libertação da citocina IFN- γ por linfócitos T sensibilizados por um antígeno específico. O teste é realizado em duas fases distintas sendo a primeira de estimulação do sangue total com tuberculina bovina e aviária durante 16 a 24 horas e a segunda de detecção e quantificação do IFN- γ produzido, através de um teste Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Em animais previamente sensibilizados por *M. bovis*, há uma maior produção de IFN- γ na estimulação com a tuberculina bovina (Tizard, 2002; Rua-Domenech *et al.*, 2006;Quinn *et al.*, 2011).

Outras metodologias utilizadas no diagnóstico de tuberculose bovina consistem em ensaios de proliferação de linfócitos ou os testes ELISA para detecção de anticorpos circulantes (embora a resposta imunitária humoral à tuberculose seja lenta e irregular) mas estes não são utilizados rotineiramente (Tizard, 2002; Rua-Domenech *et al.*, 2006; Quinn *et al.*, 2011).

O diagnóstico *post mortem* é normalmente baseado em exame anátomo-histopatológico para detecção das lesões típicas bem como em exames bacteriológicos para detecção de bactérias do CMT. As amostras adequadas para diagnóstico a serem enviadas para o laboratório são linfonodos, tecidos que contenham lesões, aspirados e leite (Quinn *et al.*, 2011). O isolamento de *M. bovis* requer a descontaminação das amostras de modo a eliminar as bactérias contaminantes de crescimento rápido. Assim, são tratadas durante cerca de 30 minutos com hidróxido de sódio 2-4% ou ácido oxálico a 5%, seguindo-se uma neutralização com um ácido ou base dependendo do descontaminante e uma centrifugação de modo a concentrar as micobactérias, sendo o sobrenadante descartado. Após centrifugação, inocula-se o depósito em meio Lowenstein-Jensen, sem glicerol e com piruvato de sódio a 0,4%, e leva-se a incubar a 37° C em ambiente aeróbio por um período de até 8 semanas. Os critérios para a identificação dos isolados são a velocidade de crescimento e a aparência das colónias, a positividade à coloração ZN, o perfil bioquímico, técnicas moleculares e analíticas as quais são agora rotineiramente utilizadas como spoligotyping e provas genéticas (Tizard, 2002; Pires *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2011).

1.1.7- Epidemiologia mundial

A tuberculose bovina é uma doença de distribuição mundial apresentando, consoante a região, diferentes valores de prevalência. Nos países conhecidos como países em vias de desenvolvimento a informação sobre a prevalência desta doença é escassa, uma vez que a sua vigilância e medidas de controlo são muitas vezes insuficientes ou mesmo inexistentes. Tal como relatado num estudo de Cosivi *et. al* (1998), há cerca de 15 anos atrás, um terço dos países africanos não tinha dados sobre a sua situação epidemiológica no que se refere à tuberculose bovina, e apenas 20% dos países que reportavam a doença tinham medidas de controlo implementadas com vista à sua erradicação, como era o caso da África do Sul. Situação semelhante foi descrita relativamente ao continente asiático, onde se estimava que 94% do gado bovino e 99% dos búfalos deste continente pertenciam a países sem programas de erradicação da tuberculose bovina, ou com programas implementados mas de abrangência muito reduzida. Na América central e do sul, aproximadamente 70% do efectivo bovino de 375 milhões encontra-se em países com prevalência de tuberculose bovina igual ou superior a 1%. A título de exemplo, estima-se que no Brasil e na Argentina, países onde a criação de

gado bovino é muito forte e embora se tenham vindo a adoptar algumas medidas de controlo, existam 3,5 milhões de animais infectados (Cosivi *et al.*, 1998; de Kantor & Ritacco, 2006).

Por outro lado, nos países mais desenvolvidos a tuberculose nos animais é rara, ocorrendo esporadicamente surtos severos num pequeno grupo de explorações. A detecção da doença ocorre normalmente no matadouro onde os inspectores ao examinarem as carcaças deparam-se com lesões e seguem os procedimentos vigentes de identificação do agente e notificação à autoridade competente (Radostits *et al.*, 2000).

Em muitos países europeus e outros como a Austrália, o Canadá ou Israel, a tuberculose bovina foi virtualmente erradicada, principalmente devido à existência e eficácia de programas de erradicação baseados em políticas de testagem de efectivos, abate de animais suspeitos e vigilância em matadouro. No entanto, em países como a Irlanda, os EUA e a Nova Zelândia, a tuberculose bovina está a reemergir devido à existência de hospedeiros silváticos reservatórios, que têm vindo a dificultar o trabalho desenvolvido com vista à erradicação da doença (Anexo I) (Radostits *et al.*, 2000).

Na UE, e de acordo com a legislação em vigor, um Estado Membro ou região é considerado oficialmente indemne de tuberculose bovina quando as seguintes condições são cumpridas: cada animal da espécie bovina está identificado e registado de acordo com a legislação comunitária; todos os bovinos abatidos são sujeitos a uma inspecção *post mortem* oficial; a percentagem anual de efectivos confirmados como infectados não excede 0,1% durante seis anos consecutivos e pelo menos 99,9% dos efectivos têm o estatuto de oficialmente indemnes de tuberculose no final de cada ano, durante um período de seis anos (Gordejo & Vermeersch, 2006; EFSA, 2013).

A lista dos Estados Membros ou regiões declaradas oficialmente indemnes de tuberculose bovina constam no Anexo I da Decisão 2003/467/CE da Comissão Europeia e subsequentes emendas (DGAV, 2011). Nesta lista, actualizada em 23 de Abril de 2012, encontram-se 17 países (Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, Eslováquia, Eslovénia, Estónia, Finlândia, França, Holanda, Letónia, Luxemburgo, Noruega, Polónia, República Checa, Suécia e Suíça) e algumas regiões de Portugal (Algarve), de Itália e do Reino Unido (Escócia) (Anexo II) (EFSA, 2013). Em alguns destes países oficialmente indemnes, a doença ainda ocorre de forma muito limitada, mas se houver uma mudança significativa nessa situação, a Comissão Europeia pode tomar a decisão de suspender ou revogar o estatuto do país em causa. De entre os 15 estados membros oficialmente indemnes de tuberculose, cinco apresentaram explorações bovinas infectadas: Alemanha, Bélgica, Holanda e Polónia

reportaram apenas raros casos, no entanto a França reportou 173 explorações com casos de tuberculose bovina. Ainda assim, devido ao baixo número de explorações infectadas quando comparadas com o número de explorações indemnes, o estatuto da França como país oficialmente indemne de tuberculose bovina foi mantido (EFSA, 2013).

Quanto aos países não oficialmente indemnes a situação agravou-se, tendo aumentado ainda que ligeiramente, o número de explorações infectadas. Assim, dos 12 países não oficialmente indemnes, 3 reportaram não ter havido qualquer caso de explorações infectadas durante 2011, ao passo que dos 9 que reportaram positividade, os valores de prevalência mantiveram-se comparáveis ou inferiores aos de 2010, à excepção do Reino Unido o qual reportou um aumento da prevalência pelo terceiro ano consecutivo, apresentando-se com a maior proporção de explorações infectadas (EFSA, 2013).

1.1.8- Epidemiologia nacional

Portugal iniciou esforços de erradicação da tuberculose bovina em 1992, tendo apresentado à UE um programa trienal com *terminús* em 1995 que foi aprovado pela Decisão da Comissão 92/299/CEE (DGV, 2011).

Em 1996, Portugal apresentou um programa com vista à obtenção de suporte financeiro, o qual não obteve participação. Apesar de não ter havido financiamento comunitário, o país continuou nos anos seguintes a desenvolver o programa de erradicação da tuberculose. O apoio financeiro viria a iniciar-se no programa aprovado para 2001, mantendo-se até aos dias de hoje e tendo sido muito importante para atingir a situação encontrada neste momento, uma fase final e difícil da erradicação da doença (DGV, 2011).

Em Portugal a tendência geral da prevalência de tuberculose bovina demonstrou uma melhoria, apesar de lenta, desde o ano de 2000, tendo atingido o seu valor mais baixo em 2008. No ano de 2009 a situação inverteu-se e a prevalência aumentou, sendo em 2010 o aumento foi ainda mais exuberante (Apêndice I) (DGV, 2011; DGV, 2012; DGAV, 2013). Este agravamento tomou particular relevo na região do Alentejo, em algumas áreas da região Centro e do Norte, e teve como suporte não só a detecção em vida na exploração mas também a detecção em matadouro, a qual por via da melhoria do fluxo de informação proporcionado pela reorganização dos serviços veterinários, revelou-se uma ferramenta indispensável para a aferição das estratégias implementadas e da capacidade de detecção em exploração. Também não é alheio a este agravamento dos indicadores epidemiológicos o facto do número de

explorações existentes em Portugal ter registado ao longo dos anos um sucessivo decréscimo e por outro lado o número de animais existentes registar algum acréscimo, traduzindo-se numa maior concentração de animais o que potencia o contacto e por conseguinte a disseminação da infecção. Para além destes factores, também a valorização das actividades de caça maior em determinadas regiões desencadeou um aumento substancial da densidade populacional destas espécies, o que nomeadamente em épocas de escassez de alimento e água pode levar a um maior contacto com os bovinos em exploração extensiva (DGAV, 2012a).

Em 2011 os valores de prevalência de tuberculose bovina em Portugal deram sinais de melhoria, a qual se veio a confirmar em 2012 com um decréscimo significativo, ainda assim longe dos mínimos de 2008 (Apêndice I) (DGV, 2011; DGV, 2012; DGAV, 2013).

Os estudos epidemiológicos realizados em 2010 revelaram como principais factores de risco a introdução de novos animais na exploração (26%), o contacto com espécies silváticas (19%), o contacto directo com outras explorações (15%) e a recorrência de infecção em explorações previamente afectadas (7%) (Fonseca, 2011).

1.1.9- Tuberculose em animais silváticos

A detecção e quantificação de animais silváticos portadores de tuberculose está bastante dificultada devido à falta de conhecimento do número e identidade exactos dos animais distribuídos pelas diferentes zonas geográficas, e também ao facto dos sintomas nestas espécies serem muito discretos ou mesmo inexistentes. Com a falta de programas específicos de epidemio-vigilância, os casos de tuberculose em animais silváticos são quase sempre diagnosticados após montarias para a caça destes animais e no seu exame *post mortem*, com o envio de amostras para diagnóstico macroscópico, histopatológico e bacteriológico (Whipple & Palmer, 2000). A aparência das lesões entre espécies pode ser distinta; enquanto as lesões granulomatosas nos bovinos domésticos são macroscopicamente necrosadas no seu interior mas apresentam uma consistência firme, nos cervídeos a necrose tende a ser mais extensa e o material no interior do granuloma tende a ser quase liquefeito. Também à observação microscópica com coloração de ZN, são evidentes diferenças, sendo a presença intralesional de bacilos álcool-ácido resistentes muito reduzida nos ovinos e caprinos (Alfonso, 2007) e bastante elevada no caso dos suínos, bovinos e veados (Ferreira & Ferreira, 1990).

Em situações como a do deslocamento de animais silváticos entre diferentes zonas geográficas, reservas de caça ou parques naturais, torna-se necessário diagnosticar a doença *in vivo*. Neste momento já é possível utilizar alguns testes comerciais para determinadas espécies silváticas, no entanto muitos desses testes ainda não foram devidamente validados ou encontram-se em processo de licenciamento (Waters *et al.*, 2008).

Apesar da tuberculose ter sido já diagnosticada em diferentes espécies silváticas, nem todas essas populações constituem um reservatório natural da doença. Esta capacidade de actuar como reservatório natural da doença depende da prevalência da infecção na população, da resposta imunológica do hospedeiro de manutenção e da relação que este mantém com o meio ambiente em que habita (Corner, 2006).

Alguns dos exemplos mais estudados de reservatórios silváticos de tuberculose com capacidade de transmissão da doença aos bovinos domésticos são o texugo-europeu (*Meles meles*) e o possum (*Trichosurus vulpecula*) como já foi referido no ponto 1.1.3. No entanto, ao nível da península ibérica, vários estudos identificam o javali (*Sus scrofa*) e o veado (*Cervus elaphus*) como importantes reservatórios da doença (Aranaz *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2006). Apesar destas espécies serem consideradas por alguns países europeus como hospedeiros acidentais (fundo de saco) sem capacidade de transmissão da doença, existem já estudos que apontam para o contrário (Mendoza *et al.*, 2006; Santos, 2007; Naranjo *et al.*, 2008).

1.2 – Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina

Em Portugal, o desenvolvimento de programas de erradicação ao longo de vários anos tem permitido a melhoria do estatuto sanitário dos efectivos nacionais. O Decreto-Lei n.º 272/2000 (DGAV, 2012) estabelece as normas técnicas de execução do Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina (PE) e os procedimentos relativos à classificação sanitária de efectivos e áreas em conformidade com a legislação comunitária.

A DGAV é a entidade responsável pela definição das estratégias, coordenação, controlo da execução e auditorias do PE. As entidades executoras das acções de campo (rastreo e saneamento) são as Organizações de Produtores Pecuários (OPPs), que apresentam para aprovação à DGAV um programa sanitário anual elaborado pelo seu Médico Veterinário Coordenador. As OPPs associam todos os criadores pecuários existentes em determinada área geográfica, de modo a que todas as explorações estejam cobertas pelas acções, sendo que cada

criador associado pode escolher o médico veterinário que durante o ano irá executar as acções no seu efectivo (DGAV, 2012a).

Segundo a legislação, é proibida a imunoprofilaxia e o tratamento terapêutico da tuberculose bovina, consistindo o PE na testagem em vida de todos os bovinos com mais de seis semanas de idade, na vigilância em matadouro, no controlo da movimentação de animais e na classificação dos efectivos (DGAV, 2012a).

As classificações sanitárias actualmente existentes são T2 - não oficialmente indemne e T3 - oficialmente indemne. Para além destas classificações sanitárias o PE admite ainda as classificações T2.1 (considerada não oficialmente indemne e usada em efectivos onde houve confirmação da doença) e T3S (utilizada sempre que se suspenda a classificação sanitária a um efectivo oficialmente indemne). No Anexo III encontram-se esquematizados os critérios para subida e descida de estatuto sanitário dos efectivos (DGAV, 2012a).

O teste de diagnóstico oficial é a prova da Intradermotuberculinização de Comparação (IDTC), que pode ser complementado com o teste IFN- γ . As explorações positivas são sujeitas a medidas de profilaxia e polícia sanitária, nomeadamente o sequestro, isolamento e abate sanitário dos animais positivos (com colheita de amostras para diagnóstico laboratorial) e desinfeção das instalações e utensílios. Os proprietários dos animais são subsidiados por cada animal sujeito ao abate sanitário de acordo com o Anexo IV (DGAV, 2012a).

No caso de novas explorações positivas, procede-se também à realização de um Inquérito Epidemiológico (IE) para a investigação da história do animal, do histórico e das características da exploração e da existência ou não de entradas e saídas de animais ou contacto com espécies silváticas, com vista a descobrir a origem da infecção e impedir a sua difusão. É de destacar a importância de duas ferramentas fundamentais neste processo, que são o Sistema Nacional de Identificação e Registo Animal (SNIRA), que permite a rastreabilidade dos bovinos através de uma base de dados informatizada e o Programa Informático de Saúde Animal (PISA), que é o sistema de informação e gestão de saúde animal oficial e que permite o acesso a toda a informação sobre o estatuto sanitário e testes de diagnóstico de todos os animais e explorações (DGAV, 2012a).

Em Portugal, existem alguns factores que parecem estar envolvidos na dificuldade em obter o estatuto de oficialmente indemne de Tuberculose, como os reservatórios silváticos de *M. bovis*, as dificuldades de ordem técnica na prova da IDTC (principalmente em explorações em extensivo e em animais de raça brava) e a falta de empenho de alguns

produtores que consideram a tuberculose bovina um problema do passado (Gordejo & Vermeersch, 2006).

1.3 – Objetivos

Esta dissertação tem como objectivo o estudo das características (tipo de lesão, idade, sexo e raça) dos abates sanitários de bovinos em território português, realizados devido à suspeita de tuberculose bovina entre o período de 1 de Janeiro de 2011 e 31 de Dezembro de 2012. Através da concretização deste objectivo, pretende-se dar a conhecer a realidade portuguesa no que respeita aos abates sanitários por suspeita de tuberculose e confrontar os dados daqui resultantes com a bibliografia nacional e internacional no intuito de otimizar eventuais melhorias ao programa de controlo e erradicação da tuberculose bovina e servir de base a futuros estudos dentro deste domínio.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- População em Estudo

Este trabalho foi realizado reunindo todos os modelos de inspecção (Anexo V) *post mortem* dos abates sanitários de tuberculose bovina, efectuados em todos os matadouros de bovinos em território português no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2011 e 31 de Dezembro de 2012. Os modelos foram preenchidos pelo inspector sanitário presente no matadouro onde foi realizado o abate sanitário e foram enviados à respectiva Direcção de Serviços Veterinários Regionais (DSVR). Todas as DSVR encaminharam essa informação para a DSSA, que reúne no seu sistema todas as informações relativas aos abates sanitários de todo o país. Assim sendo, não foi executado nenhum método de amostragem pois o estudo foi aplicado a toda a população de abates sanitários de tuberculose bovina.

As variáveis consideradas para o estudo foram as seguintes:

- I. Informação referente à inspecção *post mortem*: número de animais com lesões, número de lesões, localização das lesões e decisão do médico veterinário em relação a aprovação ou rejeição da carcaça
- II. Informação referente aos animais: idade, sexo e raça

2.2- Metodologia

Para a realização deste trabalho foi necessária a criação de uma base de dados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010. Numa primeira fase foram inseridos os dados constantes em cada modelo de inspecção *post mortem* de abate sanitário de tuberculose bovina. De realçar que cada registo informa acerca do abate sanitário de um ou mais animais, todos pertencentes à mesma exploração, realizado num determinado matadouro e num determinado dia.

Os dados recolhidos de cada modelo foram: a data do abate sanitário, o matadouro em que foi realizado, o médico veterinário presente no local, o número de animais abatidos com e sem lesões, o número de identificação dos animais, a exploração a que pertenciam, a

localização das lesões e a decisão sanitária do médico veterinário. Posteriormente, para completar a base de dados foi necessário recorrer ao *software* do SNIRA, onde através do número de identificação dos bovinos, se recolheram os dados referentes à idade, sexo e raça dos mesmos.

Numa segunda fase foi necessário desenvolver uma base de dados que permitisse realizar a análise estatística dos dados recolhidos. Para esse efeito, a idade dos animais a qual se apresentava em meses, foi organizada em grupos etários com intervalos de 2 anos até ao último grupo, onde se inseriram todos os animais com 10 ou mais anos.

No que diz respeito às lesões, devido à grande variedade de localizações e de padrões lesionais encontrados, e por forma a avaliar a dispersão da doença de uma forma mais simples e sistemática, foram consideradas 11 regiões anatómicas distintas (Tabela 2).

Tabela 2 – Região atribuída a cada localização de lesão.

Lesão	Região
Linfonodos retrofaríngeos Linfonodos mandibulares Linfonodos parotídeos	Cabeça
Pulmões Pleura Linfonodos brônquicos Linfonodos mediastínicos Linfonodos traqueais	Tórax
Tracto gastro-intestinal Linfonodos gástricos Linfonodos mesentéricos	Tracto gastro-intestinal
Baço	Baço
Fígado Linfonodos hepáticos	Fígado e linfonodos
Rins Linfonodos renais	Rins e linfonodos
Peritoneu	Peritoneu
Órgãos genitais	Órgãos genitais

Linfonodos retro-mamários Mama	Mama e linfonodos
Linfonodos poplíteos Linfonodos pré-escapulares Linfonodos axilares Linfonodos pré-crurais	Linfonodos periféricos
Outros Pele	Outros

Ao longo do trabalho foram tomadas determinadas decisões em resposta às limitações particulares deste estudo, tais opções metodológicas passam agora a ser enumeradas:

- I. Nos modelos de inspecção sanitária para os abates sanitários de tuberculose bovina, onde é mandatário identificar o número de animais abatidos e o número de animais que apresentaram lesões *post mortem*, os inspectores só devem preencher a identificação do animal, localização das lesões e decisão sanitária, nos animais que apresentem lesões à inspecção *post mortem*. Assim, todos os resultados expostos neste trabalho que tenham como alvo de estudo a localização das lesões, a decisão sanitária, o sexo, a idade ou a raça dos animais, tem como base o grupo dos animais abatidos que apresentaram lesões *post mortem* e não a população total de bovinos abatidos em abate sanitário de tuberculose bovina.
- II. Em casos de animais com ausência de informação referente a uma determinada característica que está a ser analisada, esse animal em particular é excluído do grupo em estudo, não sendo contabilizado nos resultados finais apresentados.

2.3- Análise Estatística

Este trabalho teve como base um estudo longitudinal retrospectivo aplicado a um período de 2 anos, sendo o *software* Microsoft Office Excel 2010 o programa utilizado para a criação da base de dados e elaboração dos diferentes gráficos e tabelas apresentados.

Para o estudo de hipóteses foi utilizado o *software* SPSS v20. A análise estatística presente neste trabalho incidiu sobre a estatística descritiva, onde foram utilizadas medidas de

tendência central, tais como a média e mediana, e medidas de dispersão tais como o desvio padrão e amplitude. De seguida, foi desenvolvida uma componente de estatística inferencial, onde se efectuaram regressões lineares e testes de hipóteses.

Os testes utilizados foram essencialmente não paramétricos por falha do pressuposto de aplicação, devido à ausência de normalidade. A verificação da normalidade foi efectuada mediante o tamanho do grupo em análise, utilizando-se o teste de Kolmogorov – Smirnov quando a amostra apresentava observações superiores a 50 indivíduos e Shapiro – Wilk quando a amostra apresentava observações inferiores a 50 indivíduos. Após a rejeição de normalidade ($p < 0,05$) efectuaram-se testes estatísticos alternativos à ANOVA: o teste de Kruskal – Wallis. Uma das questões subjacentes é que este teste não permite realizar exames POST – HOC o que aliado ao facto do *software* não permitir efectuar o teste de comparação múltipla Steel – Dwass limitou as conclusões estatísticas.

Para os efeitos estatísticos, o nível de significância considerado foi de 5%.

3- RESULTADOS

Foram contabilizados um total de 131 abates sanitários de tuberculose bovina em território português no ano de 2011, perfazendo 683 animais abatidos. No ano de 2012 foram contabilizados 59 abates sanitários de tuberculose bovina em território nacional, que contabilizaram 459 animais abatidos. No período dos dois anos contabilizados, foram efectuados 190 abates sanitários que totalizaram 1142 animais abatidos, o que em termos médios resulta em 6 animais por abate sanitário.

Tal como apresentado na figura 1 em baixo, dos 683 animais abatidos em 2011, apenas 333 (48,8%) apresentaram lesões à inspecção *post mortem*. Dos 459 animais sacrificados em 2012, apenas 190 (41,4%) revelaram lesões ao exame sanitário. Totalizando todo o período em análise, foram abatidos 1142 animais, dos quais 523 (45,8%) apresentaram lesões.

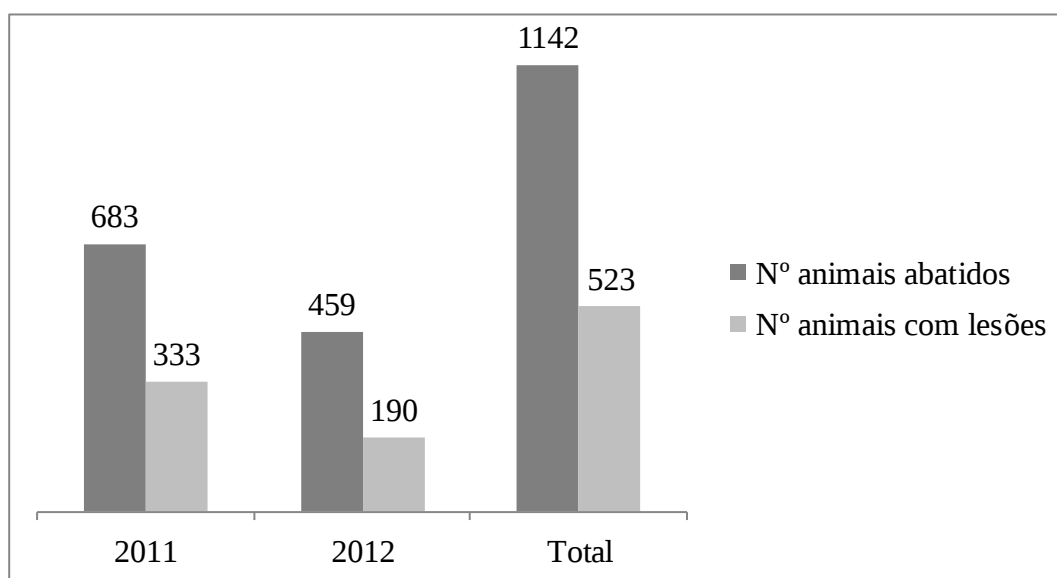


Figura 1 – Número de animais abatidos e número de animais com lesões no período em análise

3.1 – Informação Referente à Inspeção *Post Mortem*

3.1.1 - Número de lesões

Os 523 animais que tendo sido abatidos apresentaram lesões, contabilizaram um total de 1174 lesões, o que significa em média 2,24 lesões por animal. O número de lesões

detectadas ao exame *post mortem* variou entre 1 lesão e 11 lesões, não tendo ocorrido nenhum caso que apresentasse 8 lesões ou 9 lesões (Figura 2).

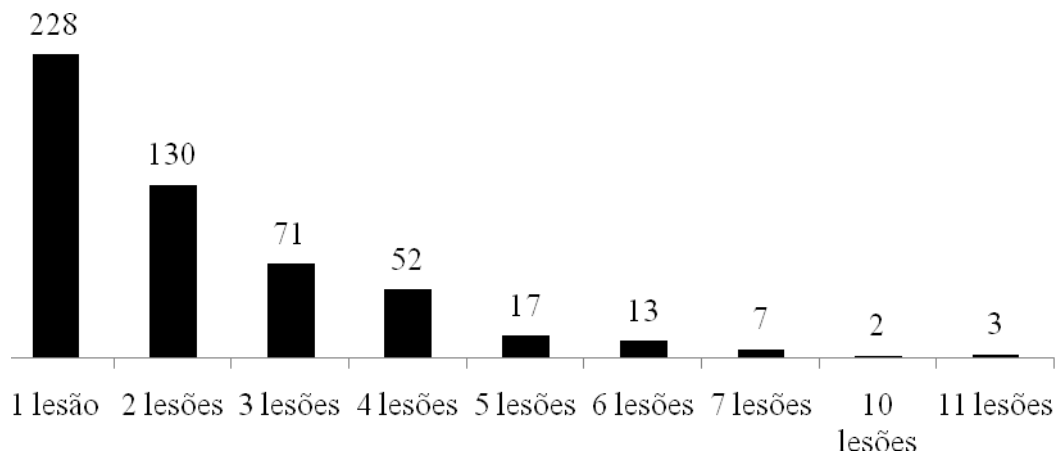


Figura 2 – Distribuição do número de animais pelo número de lesões apresentadas

É bastante evidente a existência de menor número de animais quando associados a um maior número de lesões.

3.1.2 – Número de regiões com lesão

Após classificação de todas as lesões como pertencentes a uma região de acordo com a tabela 2, os animais incluídos neste estudo contabilizaram um total de 831 regiões afectadas, o que em média significa 1,59 regiões com lesão por animal (Figura 3).

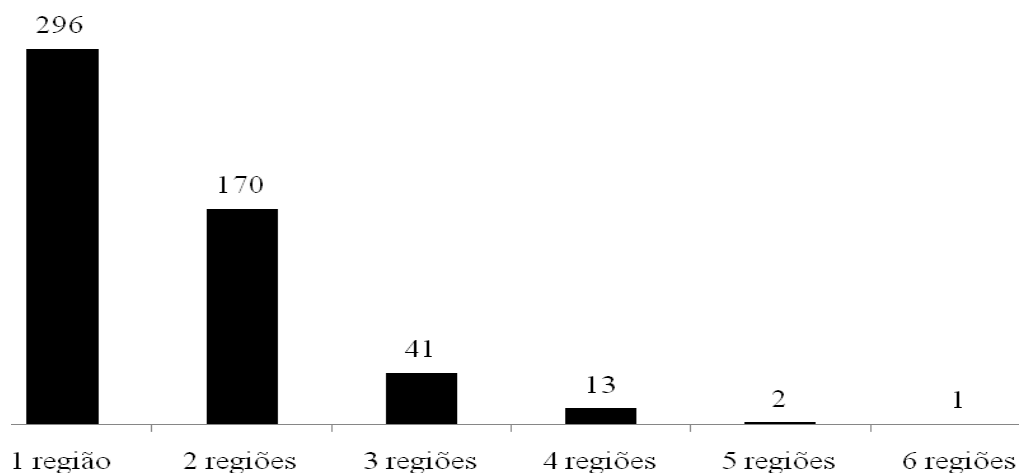


Figura 3 – Número de animais e número de regiões que em simultâneo apresentaram lesões nesses animais

Sendo o número mínimo de regiões afectadas 1 e o máximo 6, facilmente se identifica a notável tendência de quanto maior o número de regiões afectadas, menor o número de casos ocorridos. Mais de metade da amostra (56,6%) manifestou lesões em apenas 1 região, e apenas uma pequena parte da mesma (10,9%) apresentou 3 ou mais regiões afectadas no acto de inspecção *post mortem*.

3.1.3 – Localização das lesões

Em toda a amostra, dos 523 animais foram consideradas 26 diferentes localizações das lesões (Figura 4).

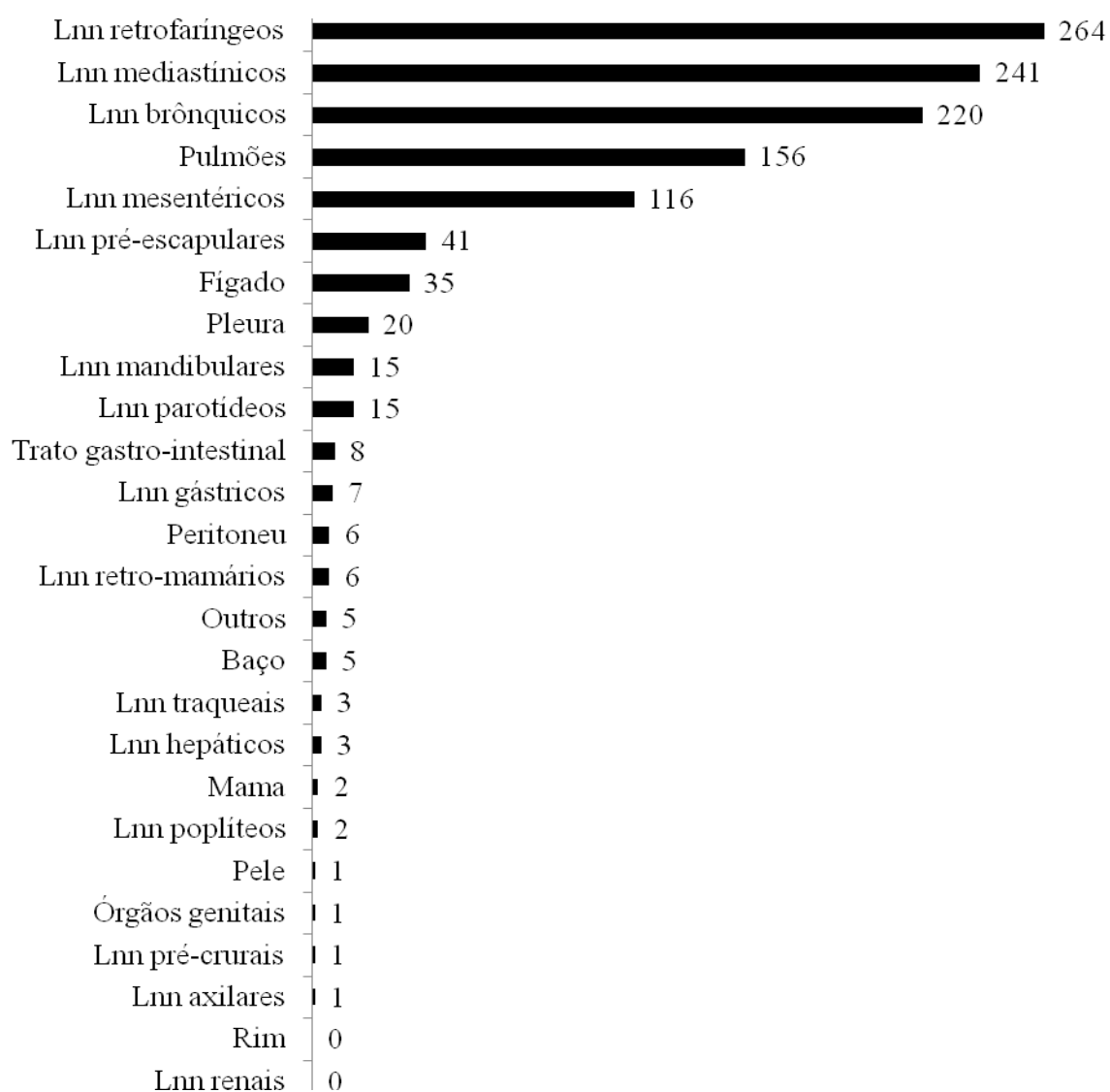


Figura 4 – Distribuição do número de animais por localização das lesões apresentadas

Como se pode constatar, as 4 localizações onde foram detectadas lesões com maior frequência, são localizações de órgãos pertencentes ao sistema respiratório, tendo este representado 881 lesões (75%) do total de lesões da amostra.

3.1.4 – Localização das regiões com lesão

Através da observação da figura 5 é evidente a superioridade das regiões "tórax" e "cabeça" como regiões mais afectadas, pois resultaram em cerca de três quartos do total de regiões com lesão, com um total de 604 bovinos (72,7%). A região do tracto gastro-intestinal foi a terceira mais afectada, representando 120 bovinos (14,4%) do total da amostra.

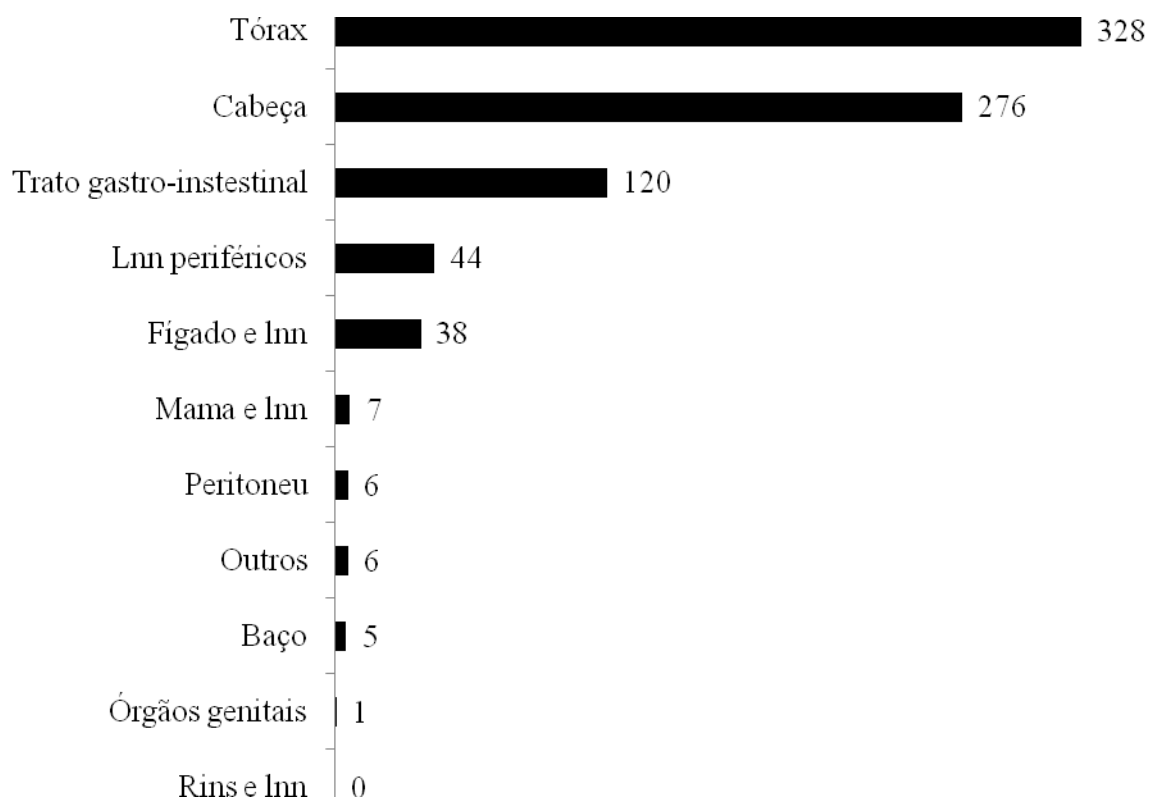


Figura 5 – Distribuição do número de animais por regiões com lesão

Na figura 6 é apresentado um gráfico com a frequência das regiões afectadas nos bovinos com a região da cabeça previamente contabilizada como uma região afectada.

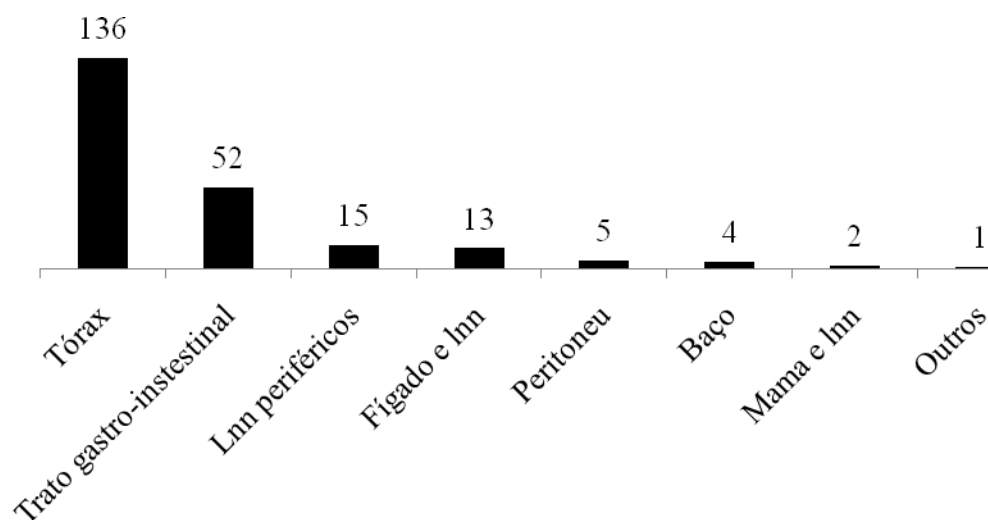


Figura 6 – Distribuição do número de animais por outras regiões com lesão para além da cabeça

Sempre que um bovino apresentava a região da cabeça afectada, as regiões concomitantemente afectadas foram a região do tórax e do trato gastro-intestinal.

Seguindo o mesmo tipo de análise, na figura 7 estão os resultados da distribuição das lesões por regiões em animais com lesões prévias na região do tórax.

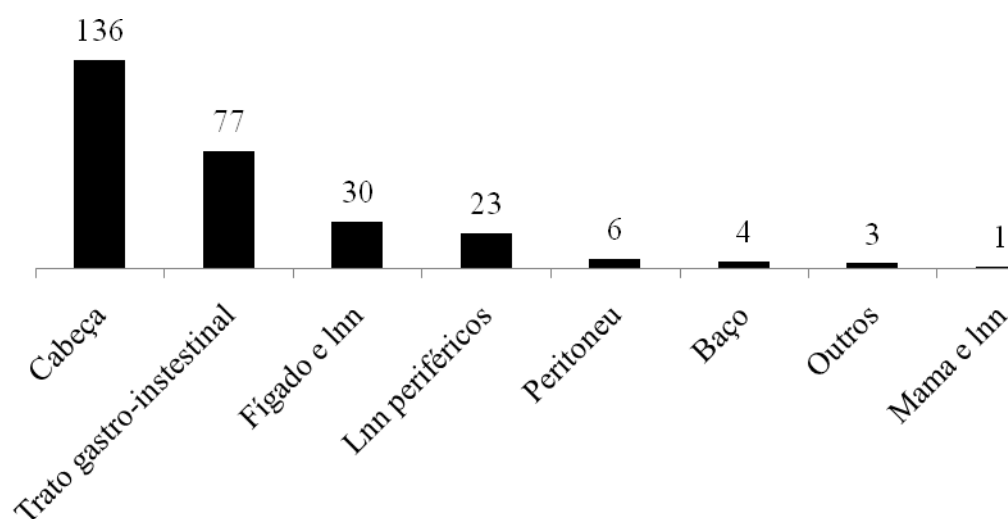


Figura 7 – Distribuição do número de animais por outras regiões com lesão para além do tórax.

É possível observar que do grupo de animais que apresentaram à inspecção sanitária lesões na região "tórax", a região da cabeça e do tracto gastro-intestinal foram as duas regiões simultaneamente mais afectadas, seguindo-se a região do fígado e dos seus linfonodos associados e a região dos linfonodos periféricos.

Na figura 8 está representada uma análise idêntica realizada para os bovinos com lesões ao nível do tracto gastro-intestinal.

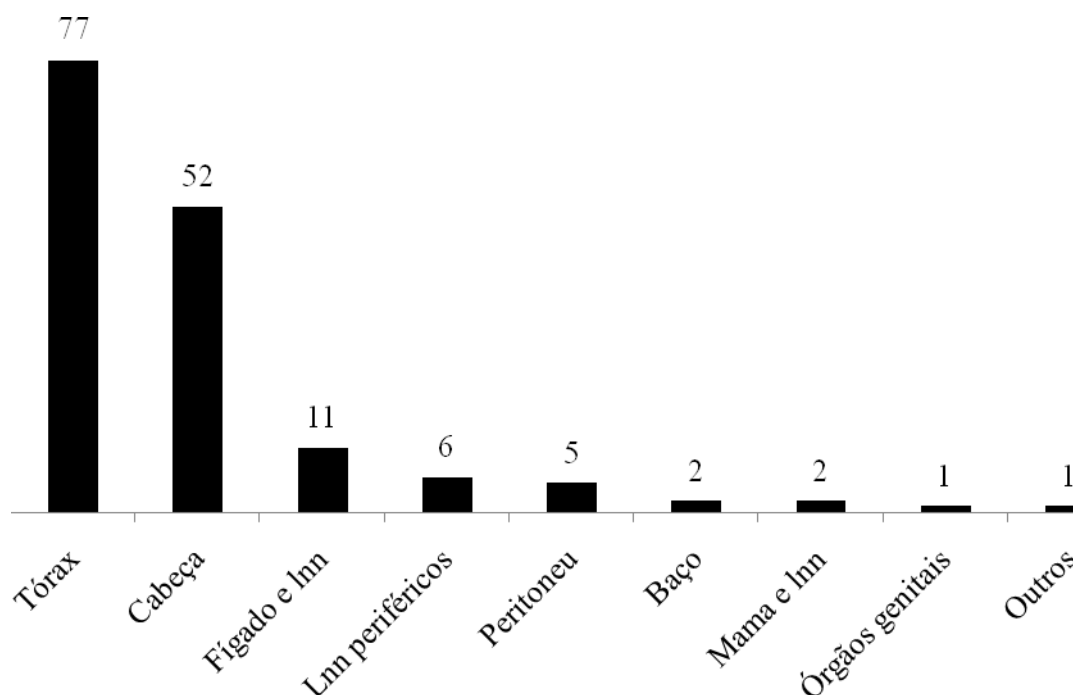


Figura 8 – Distribuição do número de animais por outras regiões com lesão para além do tracto gastro-intestinal

É possível constatar que à semelhança das situações anteriores, a região do tórax e da cabeça foram as regiões mais afectadas em bovinos que apresentaram lesões simultaneamente no tracto gastro-intestinal. Seguiram-se com menor frequência a região do fígado e seus linfonodos, a região dos linfonodos periféricos, a região do peritoneu, e com ainda menor expressão as regiões do baço, da glândula mamária e seus linfonodos, dos órgãos genitais e a região referente a outros locais.

Na figura 9 estão representados os resultados obtidos de outras regiões com lesão nos animais com lesões na região do fígado e seus linfonodos.

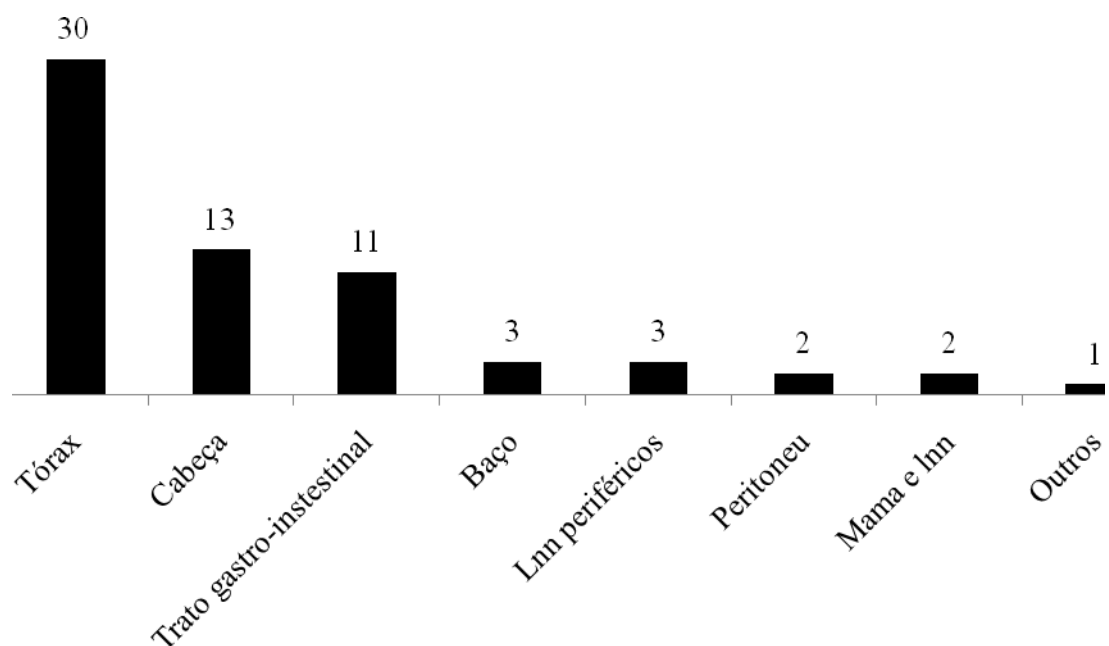


Figura 9 – Distribuição do número de animais por outras regiões com lesão para além do fígado e seus linfonodos

Como se pode constatar, nos animais que apresentaram a região do fígado e seus linfonodos com lesão, apresentaram como regiões concomitantemente afectadas, a região do tórax, da cabeça e do tracto gastro-intestinal com um número de ocorrências semelhante, seguindo-se com menor número de casos a região do baço e a região dos linfonodos periféricos. A região do peritoneu, a região da glândula mamária e seus linfonodos e a região associada a outras localizações surgiram como menos frequentes.

Na figura 10 observa-se a distribuição das regiões concomitantemente afectadas no grupo de bovinos com lesões na região dos linfonodos periféricos. Estes apresentaram simultaneamente lesões na região do tórax, seguindo-se por ordem decrescente de frequência a região da cabeça, região do tracto gastro-intestinal e região do fígado e dos seus linfonodos. Do grupo de bovinos com a região dos linfonodos periféricos afectada, nenhum animal apresentou qualquer lesão nas regiões do peritoneu, do baço, da glândula mamária e seus linfonodos e da região referente a outros locais.

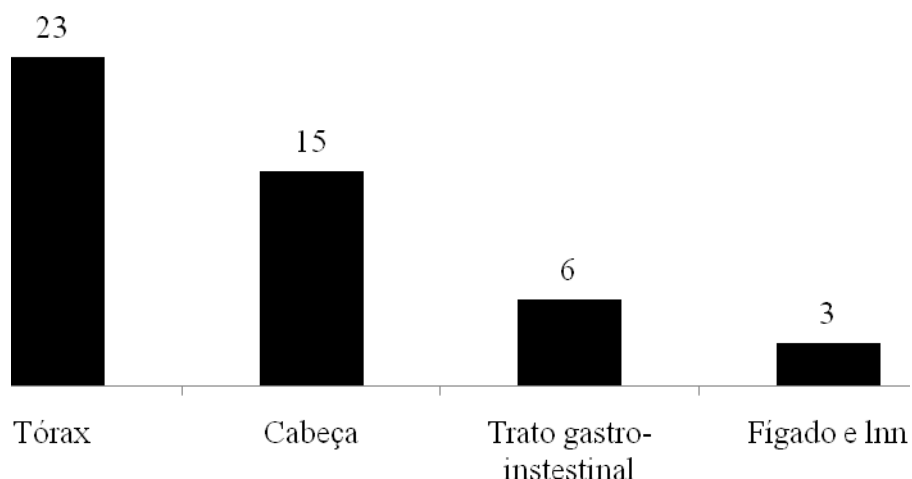


Figura 10 – Distribuição do número de animais por outras regiões com lesão para além dos linfonodos periféricos

Na figura 11 observam-se os resultados referentes ao grupo de animais com lesão na região do peritoneu.

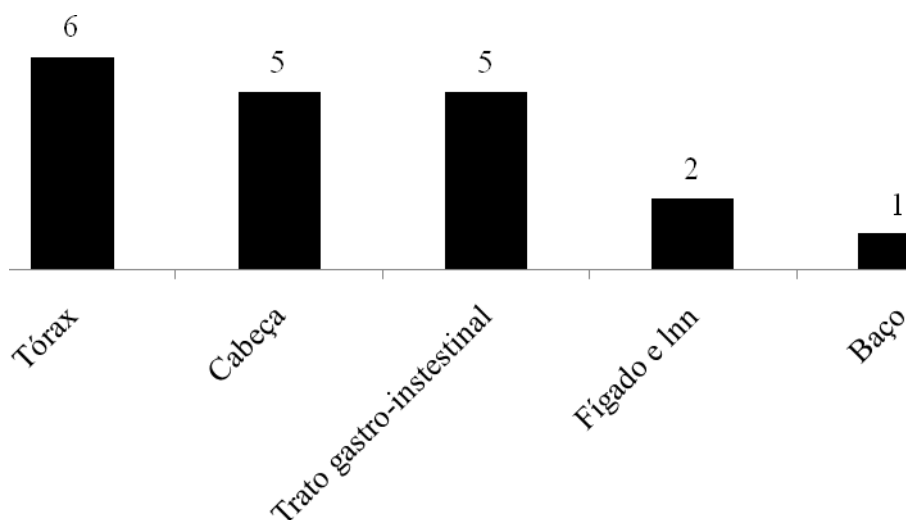


Figura 11 – Distribuição do número de animais por outras regiões com lesão para além do peritoneu

Do grupo de bovinos com lesões na região do peritoneu nenhum apresentou lesões nas regiões dos linfonodos periféricos, da glândula mamária e seus linfonodos e da região referente a outros locais. As regiões mais afectadas simultaneamente com a região peritoneu foram, a região do tórax, seguindo-se as regiões da cabeça e do tracto gastro-intestinal com

igual número de casos. A região do fígado e seus linfonodos e a região do baço, obtiveram ambas pouca expressão pois contabilizaram 2 e 1 caso respectivamente.

Para avaliar se a tendência apresentada de lesões predominantemente na região cabeça e na região tórax é estatisticamente significativa, foi realizado um teste de hipóteses. Por não se ter verificado a normalidade da amostra efectuou-se o teste alternativo à ANOVA: o teste de Kruskal – Wallis, no intuito de esclarecer as diferenças encontradas no número de lesões por região.

O teste de Kruskal – Wallis sugeriu que existiram diferenças estatisticamente significativas entre as regiões comparadas em relação ao número de lesões ($p < 0,001$).

3.1.5 – Decisão sanitária

Dos 523 animais que entraram neste estudo, apenas 7 deles possuíam decisão sanitária desconhecida. Assim, dos 516 com decisão sanitária conhecida, 255 (49,4%) foram destinados a reprovação total e 261 (50,6%) a reprovação parcial da parte afectada, das vísceras e dos linfonodos inspeccionados.

Na figura 12 está representada a relação entre a decisão sanitária tomada e o número de lesões que os animais apresentaram ao exame *post mortem*.

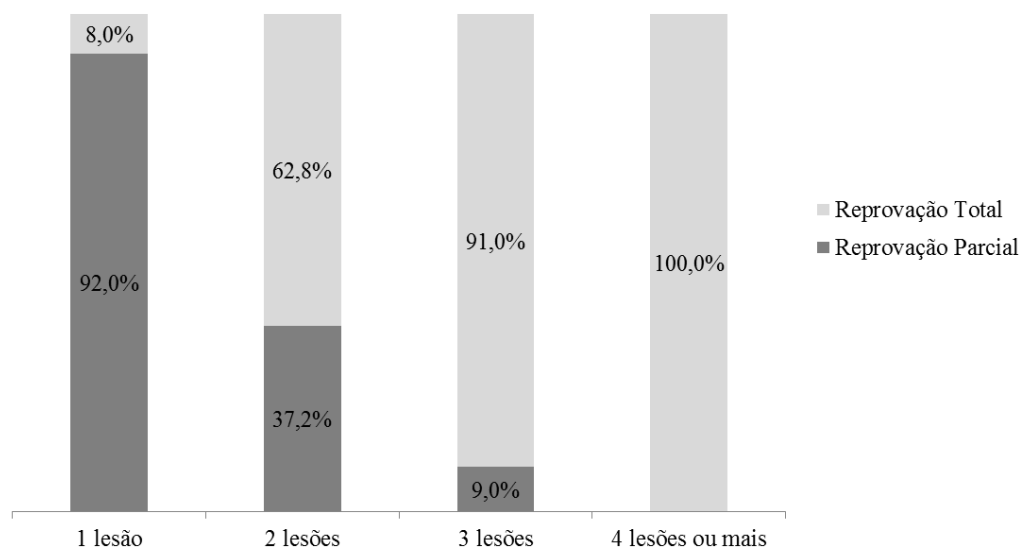


Figura 12 – Decisão sanitária em função do número de lesões

Como se observa no gráfico, todos os animais com 4 ou mais lesões detectadas no exame *post mortem* foram declarados impróprios para consumo humano. Por outro lado, nos casos de lesão única, apenas 8% foram sujeitos a reprovação total. Animais com 2 ou 3 lesões foram na sua grande maioria também declarados impróprios para consumo humano.

Na figura 13 é possível observar-se a decisão sanitária tomada em função do número de regiões afectadas.

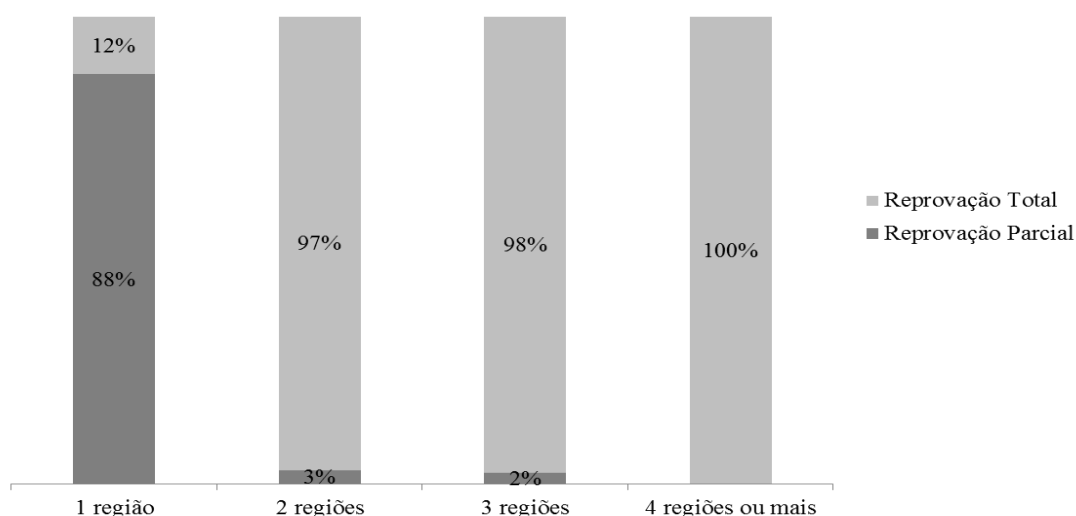


Figura 13 – Decisão sanitária em função do número de regiões com lesões

Todos os animais com 4 ou mais regiões afectadas foram sujeitos a reprovação total. De entre os animais que apenas tinham 1 região afectada, 12% foram considerados impróprios para consumo humano. Nos casos com 2 e 3 regiões afectadas, a reprovação total foi a decisão sanitária que prevaleceu com taxas de reprovação total de 97% e 98% respectivamente.

3.2- Informação Referente aos Animais

3.2.1 - Idade

Dos 523 animais que apresentavam lesões no exame *post mortem*, foi possível obter a idade de 514. Foram excluídos assim, 9 animais do estudo da variável idade. Os bovinos considerados apresentaram uma idade média em meses de 79,8, o que corresponde a 6,7 anos.

O animal mais novo possuía 2 meses de idade e apresentava uma lesão ao nível dos linfonodos pré-escapulares, e o mais velho tinha 218 meses o que corresponde a 18 anos e 2 meses e apresentava lesões disseminadas. A distribuição das idades dos animais pode ser observada com mais detalhe na tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição da idade dos animais sujeitos a abate sanitário de tuberculose bovina, considerando-se intervalos etários de 2 anos.

Idade (anos)	N	%	% acumulada
[0-2[	81	15,8	15,8
[2-4[	70	13,6	29,4
[4-6[	100	19,5	48,8
[6-8[	85	16,5	65,4
[8-10[	66	12,8	78,2
10 +	112	21,8	100,0
Total	514	100,0	100,0

Na figura 14 ilustra-se sob a forma de gráfico a distribuição do número de lesões por intervalos de idades.

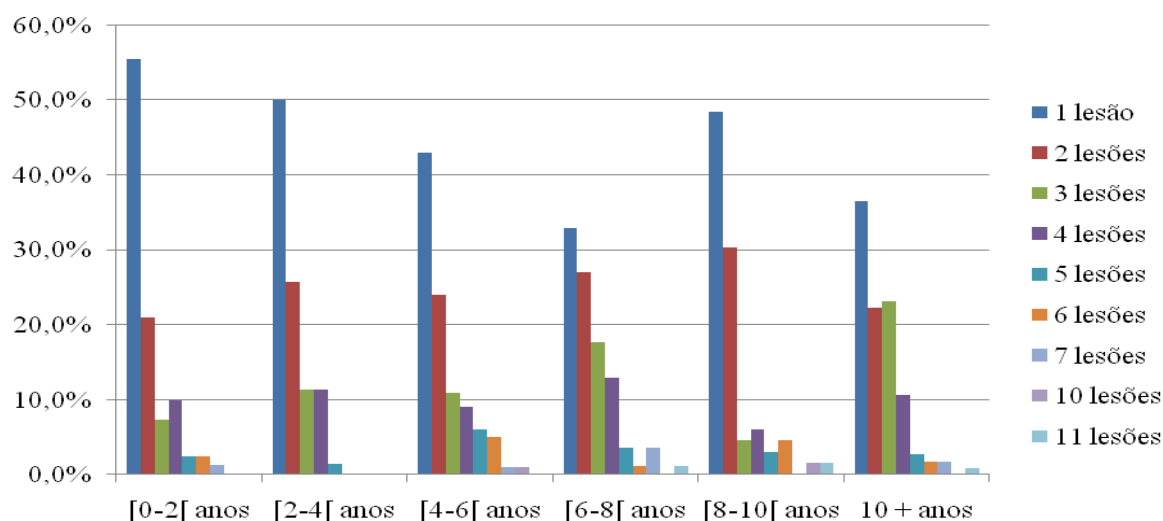


Figura 14 – Distribuição do número de lesões por animal, organizados por intervalos de idades

Em todos os intervalos etários predominaram os casos com apenas 1 lesão, seguindo-se os casos com 2 lesões à excepção do grupo dos animais com idade igual ou superior a 10 anos, onde os casos com 3 lesões são ligeiramente superiores aos de 2 lesões.

Invariavelmente em todos os grupos etários, os casos com 1, 2 ou 3 lesões representaram mais de 75% dos animais.

Na figura 15 observa-se a distribuição do número de regiões com lesão por intervalos de idades. O número máximo de regiões afectadas foram 6 e estavam presentes em animais com idade compreendida entre 4 e 5 anos. Animais com 5 regiões afectadas foram todos pertencentes ao grupo etário dos 8 - 9 anos.

Estando o número de regiões que contabilizam lesões relacionado com o número de lesões detectadas ao exame *post mortem*, em todos os grupos etários os casos com 1 região afectada foram predominantes.

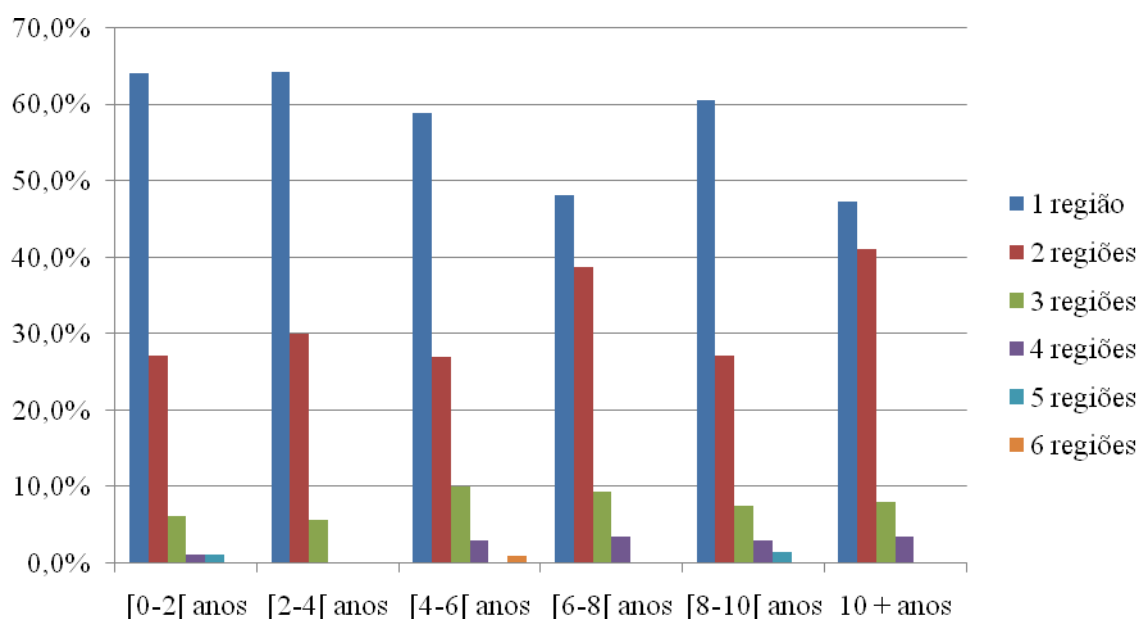


Figura 15 – Distribuição do número de regiões afectadas por animal e por intervalos de idades

Na figura 16 ilustra-se o estudo de dispersão com uma linha de tendência linear onde é possível observar que em média o número de lesões aumenta quando a idade dos animais aumenta.

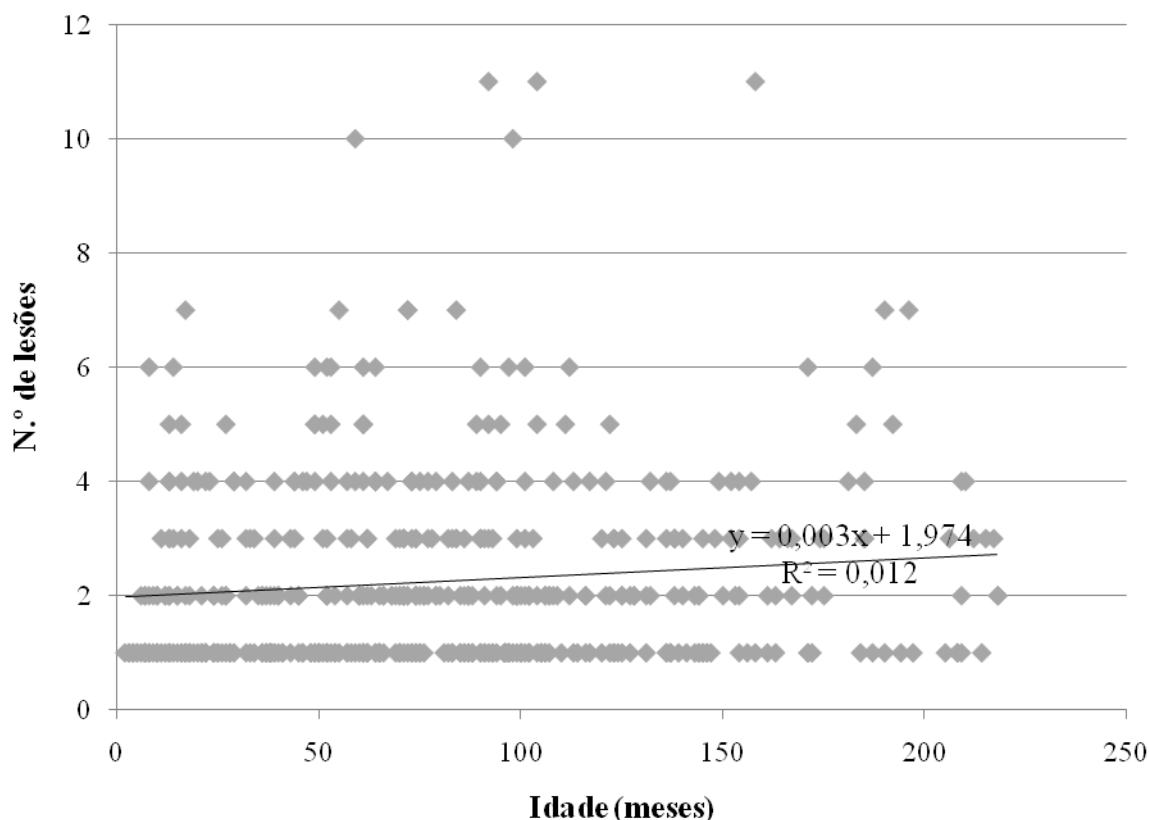


Figura 16 – Gráfico de dispersão do número de lesões por animal em função da idade dos animais com linha de tendência linear

Constatou-se que a classe de idades entre o nascimento e os dois anos apresentou uma média de 1,93 lesões por indivíduo, com um intervalo de confiança de 95% [1,62 – 2,23] e com um desvio padrão de 1,38. O número mínimo de lesões observadas neste grupo etário foi de 1 lesão e o máximo de 7.

O grupo etário dos dois aos quatro anos apresentou uma média de 1,89 lesões por animal, com um intervalo de confiança de 95% [1,62 – 2,15] e com um desvio padrão de 1,10. O número mínimo de lesões observadas foi de 1 lesão e o máximo de 5.

Os animais com idades compreendidas entre os quatro e os seis anos apresentaram uma média de 2,37 lesões, com um intervalo de confiança de 95% [2,02 – 2,72] e com um desvio padrão de 1,74. O número mínimo de lesões apresentadas foi de 1 lesão e o máximo de 10.

Em relação ao grupo etário dos seis aos oito anos, apresentou uma média de 2,54 lesões por animal, com um intervalo de confiança de 95% [2,16 – 2,92] e com um desvio padrão de 1,76. O número mínimo de lesões foi de uma e o máximo de onze.

A classe de idades entre os oito e os dez anos apresentou uma média de 2,18 lesões por indivíduo, com um intervalo de confiança 95% [1,69 – 2,67] e com desvio padrão de 1,99. O número mínimo de lesões observada neste grupo etário foi de 1 lesão e o máximo foi de 11 lesões.

Por último, os animais com idade igual ou superior a dez anos apresentaram uma média de 2,39 lesões por animal, com um intervalo de confiança de 95% [2,09 – 2,70] e com um desvio padrão de 1,62. O número mínimo de lesões foi de 1 lesão e o máximo de 11.

Para avaliar se os resultados obtidos eram estatisticamente significativos, ou seja, se as diferenças do número de lesões pelos diversos grupos etários eram estatisticamente significativas, procedeu-se à aplicação de um teste de hipóteses.

Para verificar a normalidade da amostra utilizou-se o teste de Kolmogorov – Smirnov pois todos os grupos em análise apresentavam observações superiores a cinquenta indivíduos.

Por não se ter verificado a normalidade efectuou-se o teste alternativo à ANOVA: o teste de Kruskal Wallis, o qual sugeriu que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos etários no que diz respeito ao número de lesões ($p = 0,022$).

3.2.2 – Sexo

De entre os 515 animais em causa neste estudo e com a informação referente ao sexo conhecida, 456 (88,5%) eram do sexo feminino e 59 (11,5%) eram do sexo masculino.

A figura 17 representa a distribuição do sexo dos animais pelo número de lesões.

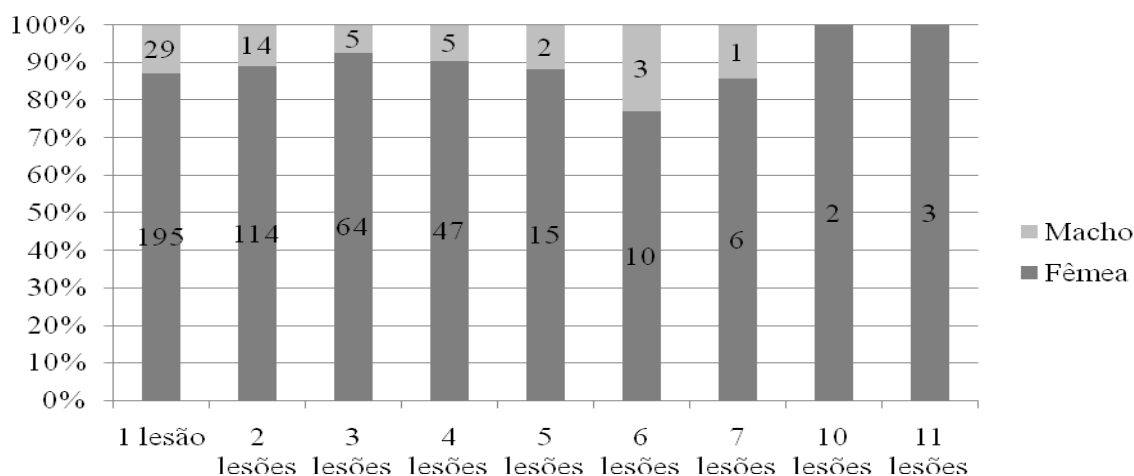


Figura 17 – Animais submetidos a abate sanitário em função do número de lesões apresentadas e do género

É possível constatar que a proporção entre machos e fêmeas é praticamente constante, à excepção do grupo dos animais com 6 lesões, onde se identifica uma elevada percentagem de machos (23,1%) comparativamente à sua representatividade na amostra (11,5%), e dos grupos dos animais com 10 lesões e 11 lesões onde o número de casos foi de 2 e 3 animais respectivamente, sendo estes na sua totalidade do sexo feminino.

De seguida, na figura 18 está representada a distribuição do sexo dos bovinos pelo número de regiões com lesão e à semelhança da figura anterior a proporção entre machos e fêmeas em todos os grupos é equiparável à proporção entre machos e fêmeas na amostra, com excepção do grupo de animais com 5 regiões afectadas, o qual contabilizou 1 caso de cada sexo, e do grupo de animais com 6 regiões com lesão, o qual contabilizou apenas 1 caso do sexo feminino. Nos outros grupos a percentagem de machos oscilou entre 7,7% e 12,2% e a das fêmeas variou entre 87,8% e 92,3%, o que vai de encontro à proporção entre os dois sexos na amostra, onde mais concretamente os machos representam 11,5% e as fêmeas 88,5%.

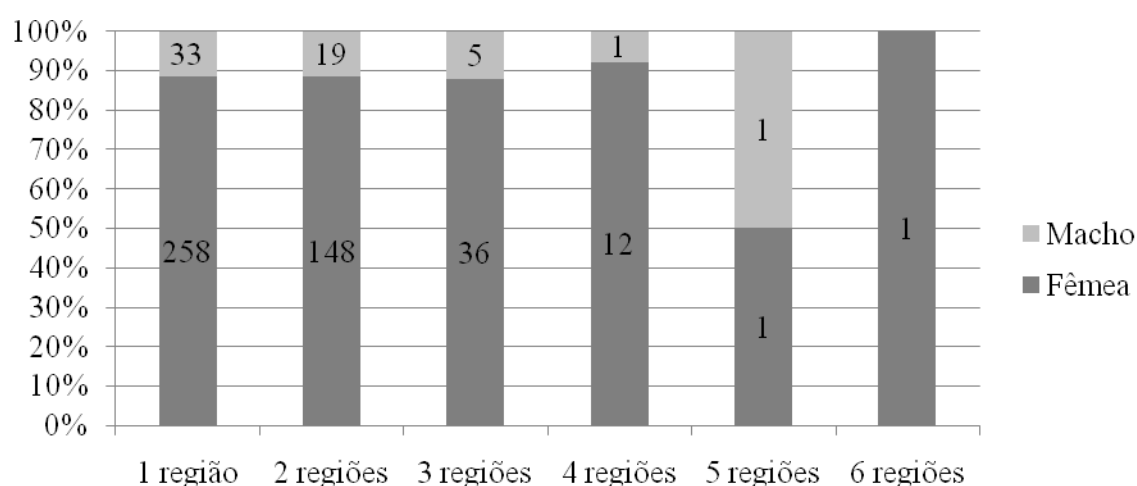


Figura 18 – Distribuição do sexo dos animais submetidos a abate sanitário em função do número de regiões com lesão

3.2.3 – Raça

Dos 523 animais que fizeram parte deste estudo, não foi possível obter a raça em 8 deles.

Na tabela 4 é possível observar a distribuição das raças dos animais que integram este estudo.

Tabela 4 – Distribuição das raças dos animais sujeitos a abate sanitário nos anos de 2011 e 2012 em território português

Raça	N animais	%	% acumulada
“Cruzada de carne”	173	33,6	33,6
Maronesa	135	26,2	59,8
Mirandesa	80	15,5	75,3
Preta	24	4,7	80,0
Cruzada de Charolês	24	4,7	84,7
Cruzada de Limousine	21	4,1	88,7
Raça indeterminada com aptidão para carne	19	3,7	92,4
Brava	13	2,5	95,0
Frísia	9	1,7	96,7
Alentejana	7	1,4	98,1
Raça indeterminada com aptidão leiteira	2	0,4	98,4
Limousine	2	0,4	98,8
Minhota	2	0,4	99,2
Barrosã	1	0,2	99,4
Charolesa	1	0,2	99,6
Mertolenga	1	0,2	99,8
“Cruzada de leite”	1	0,2	100,0
Total	515	100,0	100,0

Dos 515 animais em que foi possível obter a informação relativa à raça, a “Cruzada de carne” foi a que apresentou maior número de abates sanitários por tuberculose (33,6%), seguida por duas raças puras autóctones, a Maronesa (26,2%) e a Mirandesa (15,5%). Importante sublinhar que estas três raças representaram mais de três quartos dos animais sujeitos a abate sanitário por tuberculose (75,3%). Os restantes 24,7% da amostra incluíram 14 raças sendo que nenhuma obteve uma representatividade igual ou superior a 5%, tendo sido as raças Barrosã, Charolesa, Mertolenga e “Cruzada de leite” as que apresentaram menor número de casos com apenas 1 caso (0,2%) em cada.

Tabela 5 – Distribuição das lesões pelas raças dos animais sujeitos a abate sanitário nos anos de 2011 e 2012 em território português

Raça	N de lesões	%	% acumulada
Maronesa	469	40,4	40,4
“Cruzada de carne”	289	24,9	65,3
Mirandesa	159	13,7	79,1
Cruzada de Charolês	40	3,4	82,5
Preta	38	3,3	85,8
Indeterminada com aptidão para carne	37	3,2	89,0
Cruzada de Limousine	37	3,2	92,2
Brava	26	2,2	94,4
Alentejana	22	1,9	96,3
Minhota	13	1,1	97,4
Frísia	11	0,9	98,4
Limousine	5	0,4	98,8
“Cruzada de leite”	5	0,4	99,2
Barrosã	4	0,3	99,6
Indeterminada com aptidão para leite	3	0,3	99,8
Charolesa	1	0,1	99,9
Mertolenga	1	0,1	100,0
Total	1160	100,0	100,0

Na tabela 5 é possível observar o número de lesões contabilizadas pelos diversos animais pertencentes às diversas raças presentes na amostra. Os animais pertencentes à raça Maronesa contabilizaram mais de 40% do total de lesões. Seguiram-se os animais pertencentes à denominação “Cruzado de carne” e os animais pertencentes à raça pura Mirandesa. Contabilizando as lesões apresentadas por estas três raças referidas obtemos 79,1% do total de lesões detectadas na inspecção sanitária.

Na figura 19 observa-se a distribuição das raças pelos animais e pelas lesões da amostra.

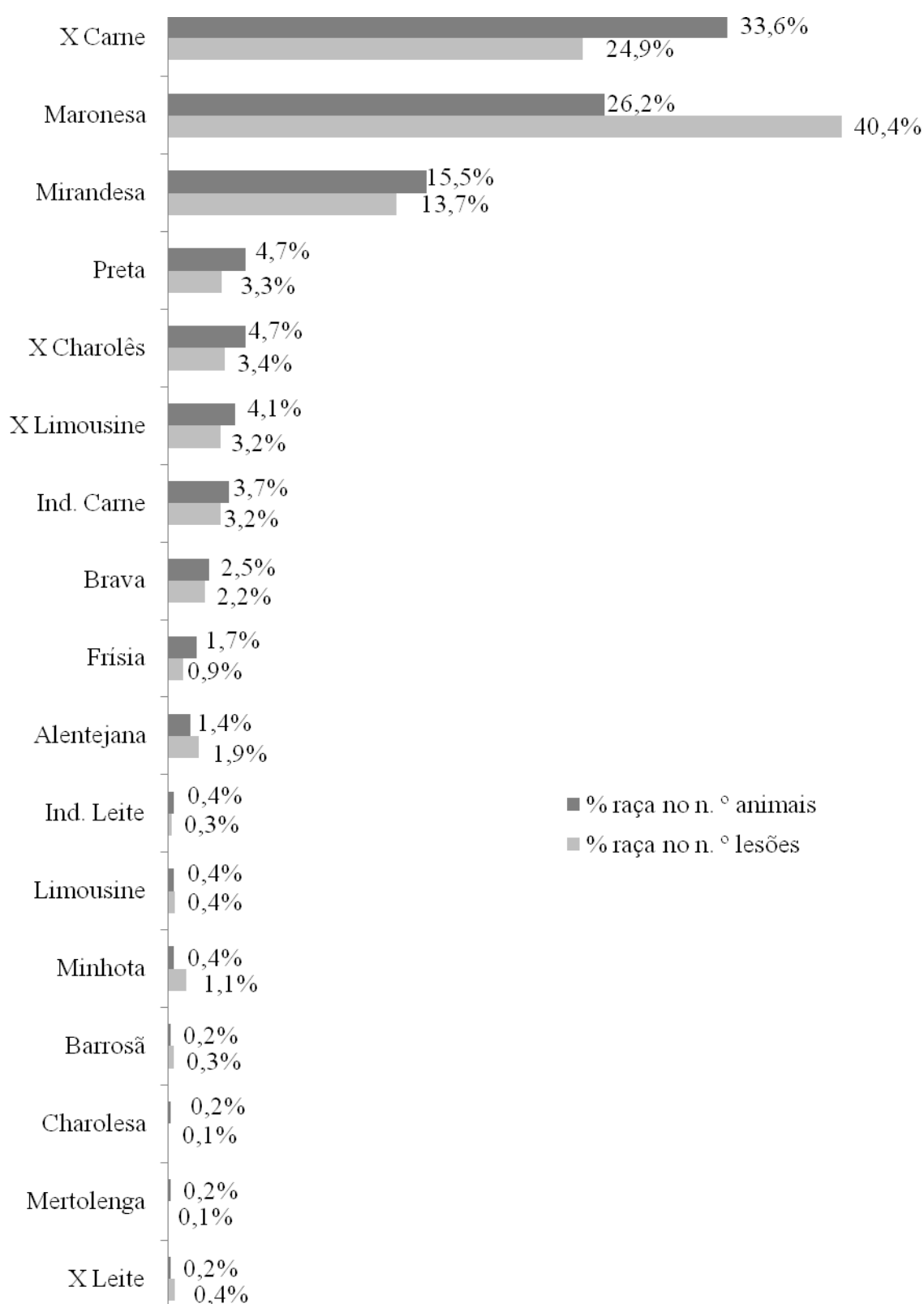


Figura 19 – Distribuição das raças dos animais abatidos e das lesões apresentadas aquando da inspecção sanitária

A raça “Cruzada de carne” contabilizou 33,6% do número de animais presentes na amostra. Relativamente ao número de lesões foi menos representativa, com 24,9%.

A raça Maronesa representou apenas 26,2% dos animais presentes neste estudo, mas em termos de lesões representou 40,4% das mesmas.

Para avaliar se os resultados obtidos são estatisticamente significativos, ou seja, se as diferenças do número de lesões pelas diversas raças são estatisticamente significativas, procedeu-se à aplicação de um teste de hipóteses.

Verificou-se a normalidade da amostra utilizando o teste de Kolmogorov – Smirnov quando a mesma apresentava observações superiores a 50 indivíduos e Shapiro – Wilk quando apresentava observações inferiores a 50 indivíduos.

Por não se ter verificado a normalidade efectuou-se o teste alternativo à ANOVA: o teste de Kruskal Wallis, o qual sugeriu que existem diferenças estatisticamente significativas no que concerne ao número de lesões entre as diversas raças ($p < 0,001$).

4- DISCUSSÃO

No presente estudo que incluiu 1142 bovinos submetidos a abate sanitário por tuberculose bovina, 523 (45,8%) apresentaram lesões à inspecção sanitária. Estes resultados são justificados pelo facto de Portugal ter um programa de controlo e erradicação da tuberculose bovina, com rastreios frequentes, o que aliado a elevada sensibilidade da IDTC, possibilita a detecção de animais infectados em fases ainda sub-clínicas, onde as lesões são ainda muitas vezes imperceptíveis ao olho humano (Tizard, 2002; DGAV, 2012).

4.1- Informação Referente à Inspecção *Post Mortem*

4.1.1- Número de lesões

Os 523 animais incluídos neste estudo apresentaram um total de 1174 lesões, o que em média significa 2,24 lesões por animal. Este valor não é semelhante aos relatórios dos matadouros da Irlanda do Norte, país que em 1982 já tinha um programa de testagem e abate de positivos semelhante ao de Portugal, onde se revela que entre 1982 e 1990 foram abatidos 2886 animais com lesões de tuberculose bovina, e que estes apresentavam em média 1,2 lesões por animal (Neill *et al.*, 1994). Importante referir que estes dados são provenientes de um período em que a inspecção sanitária não estava ainda padronizada pelos diversos países da UE, não sendo de todo tão exaustiva e exigente como a que se pratica na actualidade, existindo assim a possibilidade do valor médio de 1,2 lesões por animal tenha sido inferior à realidade.

No presente estudo a grande maioria dos animais evidenciou um número reduzido de lesões à inspecção *post mortem*, sendo o número de casos de tuberculose generalizada pouco mais de metade dos animais em estudo (56,4%). Esta característica vai de encontro ao reportado anteriormente num estudo que envolveu 374 animais com tuberculose, dos quais 66% apresentavam apenas uma única lesão (Corner, 1994). Num outro estudo, apesar de a amostra ser composta por um número de bovinos muito inferior, 46,7% dos animais apresentavam lesões apenas numa localização. Este valor é muito semelhante ao encontrado neste estudo, onde 43,6% dos animais tinham uma única lesão (Whipple *et al.*, 1996).

4.1.2- Número de regiões com lesão

Como referido anteriormente, o número médio de lesões por animal foi de 2,24, no entanto o número médio de regiões afectadas por animal verificou-se inferior, com um valor médio de 1,59 regiões com lesão por animal. Isto indica-nos que diversos animais apresentaram 2 ou mais lesões com localizações diferentes mas pertencentes à mesma região. Exemplificando, contabilizaram-se 47 animais com lesões simultaneamente nos linfonodos brônquicos e nos linfonodos mediastínicos, sendo que ambas as localizações supracitadas, classificadas de acordo com a tabela 2, pertencem à região tórax. Assim se justificam os bem diferentes valores médios do número de lesões e número de regiões afectadas por animal.

Estando o número de regiões afectadas relacionado com o número de lesões, no presente estudo 56,6% dos animais possuíam lesões em apenas 1 região, sendo uma percentagem que se assemelha aos valores descritos por outros autores (Coetzer & Tustin, 2004; Alfonso, 2007).

Sendo Portugal um país numa fase de pré-erradicação em que o número de casos é baixo e os esforços de erradicação já perduram há longos anos (DGAV, 2012a), é de esperar que o número de animais com tuberculose generalizada seja baixo, predominando os casos com lesões numa única região (Coetzer & Tustin, 2004; Alfonso, 2007).

4.1.3- Localização das lesões

Os resultados obtidos relativamente à distribuição lesional referem que os linfonodos envolvidos no tracto respiratório, os linfonodos referentes à região da cabeça e os próprios pulmões, são as localizações mais vezes afectadas, tendo representado 75% do número total de lesões. Está descrita a detecção de 86% dos animais infectados por tuberculose em exame *post mortem* através da inspecção de três pares de linfonodos (linfonodos retrofaríngeos, linfonodos brônquicos e linfonodos mediastínicos) e pulmões (Corner, 1994).

É de salientar o facto dos animais com lesões únicas apresentarem os linfonodos retrofaríngeos afectados em 29,4% dos casos, os linfonodos mediastínicos em 28,2% dos casos, os linfonodos brônquicos em 18% dos casos e os pulmões em 9,8% dos casos (Corner, 1994); estes resultados seguem a mesma ordem de ocorrência dos resultados obtidos neste estudo, onde se obtiveram 47,8%, 12,7%, 11,8% e 3,5% respectivamente. Estes resultados

podem ser justificados pelo facto da via aerógena ser a via mais frequente de infecção de tuberculose bovina (Radostits *et al.*, 2000; Alfonso, 2007).

Relativamente aos casos com lesões nos linfonodos mesentéricos, que neste estudo representam 9,9% do total de lesões, estes são suportados no facto da via alimentar não ser uma via comum na infecção da tuberculose bovina, pois o número de lesões nos linfonodos mesentéricos advém normalmente de infecções secundárias por ingestão das descargas do tracto respiratório, as quais em períodos de excreção, contêm concentrações elevadas do agente da tuberculose bovina (Neill *et al.*, 1994; Radostits *et al.*, 2000; Alfonso, 2007; Liebana *et al.*, 2008).

As restantes localizações foram pouco representativas, tendo significado aproximadamente 12,5% do total de lesões. Este valor é um pouco superior aos cerca de 7% referidos por Neill *et al.* (1994), sendo ainda assim um valor baixo. É aceitável justificar esta diferença com o facto de que no período em que foi realizado o estudo citado a inspecção sanitária não estava padronizada por entre os diversos países da UE.

4.1.4- Localização das regiões com lesão

Aquando da análise da distribuição lesional por região, os resultados demonstram de forma clara a ocorrência superior da região do tórax e da região da cabeça, justificando-se pelo elevado número de lesões detectadas nos pulmões, nos linfonodos do tracto respiratório e da cabeça, localizações que de acordo com a tabela 2 foram classificadas como pertencentes à região tórax e região cabeça respectivamente. O tracto gastro-intestinal surge como a terceira região mais afectada, principalmente devido ao considerável número de lesões ao nível dos linfonodos mesentéricos e uma vez que a ocorrência de lesões ao nível das vísceras digestivas foi bastante reduzida. Apesar da infecção pela via oral ser possível, neste estudo onde 120 bovinos demonstraram lesões ao nível do tracto gastro-intestinal, apenas 24 demonstravam lesões unicamente nessa região. Bovinos com tuberculose que apresentem lesão unicamente nos linfonodos mesentéricos não são um achado frequente mas ocorrem ocasionalmente, resultante da ingestão de uma grande carga bacteriana, assim como da ingestão de leite infectado. Contudo, também é sugerido que podem resultar da disseminação de complexos primários em outros locais (Radostits *et al.*, 2000; Neill *et al.*, 2001; Tizard, 2004).

As restantes regiões apresentam-se como pouco representativas, tendo contabilizado em conjunto cerca de 13% de regiões afectadas. Num estudo recentemente realizado no

matadouro de Maiduguri na Nigéria, que envolveu 11006 animais com lesões compatíveis de tuberculose bovina, os pulmões e os linfonodos foram os órgãos destacadamente mais vezes afectados, mas ainda assim o fígado estava afectado em 8,6% dos casos e os rins em 4,0% dos casos (Abubakar *et al.*, 2011). Estes resultados são bastante superiores aos presentes neste estudo onde a região fígado e seus linfonodos apenas representam 4,6% do total de regiões afectadas, e a região dos rins e dos seus linfonodos não representa nenhum caso. Uma possível causa para a divergência nestes resultados é o facto da Nigéria ser um país que, tal como a maioria dos países africanos, não possui nenhum programa de controlo e erradicação da tuberculose bovina, o que torna a proporção de animais com doença generalizada ao nível sistémico muito superior, sendo os animais destes países os que mais frequentemente apresentam lesões em órgãos que não são tipicamente afectados como é o caso do fígado, dos rins ou outros como os órgãos genitais ou glândula mamária (Coetzer & Tustin, 2004; Alfonso, 2007).

Dos resultados que contabilizam as outras regiões afectadas para além de uma região primeiramente considerada é possível verificar que independentemente da região que se considere afectada primeiramente, a região do tórax, a região da cabeça e a região do tracto gastro-intestinal foram sempre as mais afectadas em simultâneo. Posteriormente a estas regiões surgem outras com alguma variância conforme a região que se escolha como afectada primeiramente. Isto prende-se com o facto da via preferencial de infecção ser a via aerógena, manifestando-se a maioria das lesões ao nível dos linfonodos torácicos, pulmões e linfonodos da cabeça (Alfonso, 2007). A considerável ocorrência de casos com o tracto gastro-intestinal afectado, tal como dito anteriormente, decorre da ingestão de descargas altamente contaminadas com origem no tracto respiratório, pois a via oral não é uma via preferencial para a infecção com tuberculose bovina (Neill *et al.*, 1994; Radostits *et al.*, 2000; Alfonso, 2007; Liebana *et al.*, 2008).

4.1.5- Decisão sanitária

Considerando que no presente estudo foram analisados dados relativos a 523 animais e havendo 7 casos não contabilizados dada a sua decisão sanitária desconhecida, o número de carcaças aprovadas para consumo humano (50,6%) foi pouco superior ao número de carcaças rejeitadas para consumo humano (49,4%). Se considerarmos o resultado médio de 1,59 regiões com lesão por animal, pode considerar-se que os resultados relativos à decisão

sanitária estão concordantes com as recomendações da DGAV, de que carcaças de animais com lesões em apenas uma única região devem ser aprovadas para consumo humano e carcaças de animais com lesões em mais do que uma região devem ser consideradas impróprias para consumo humano (DGV, 2011).

Quando se observam os resultados relativos à decisão sanitária tomada em função do número de lesões, é possível identificar que nenhum animal com 4 ou mais lesões foi aprovado para consumo humano. Tal aconteceu devido ao facto de nenhum animal ter apresentado mais de 3 lesões na mesma região, ou seja, em animais com 4 lesões houve sempre o mínimo de duas regiões afectadas levando à rejeição total da carcaça (DGV, 2011).

Verificou-se que 37,2% das carcaças foram aprovadas com 2 lesões e 9,0% com 3 lesões. Tal justifica-se devido a estas lesões terem sido encontradas na mesma região, maioritariamente na região torácica.

Existiram ainda bovinos que apresentaram apenas uma lesão à inspecção sanitária e no entanto foram reprovados. É importante recordar que o processo de inspecção sanitária de animais reactivos à tuberculina e a decisão sanitária tomada nesses casos não se resume à contagem do número de lesões, pois como se trata de uma doença crónica que afecta os animais a vários níveis, muitos destes são reprovados por causas secundárias à doença. Nos relatórios de inspecção *post mortem* foi possível constatar referências a situações de reprovação total por hidroémia, por politraumatismos, por alteração da gordura ou por magreza extrema.

Aquando da análise dos dados relativos à decisão sanitária adoptada em função do número de regiões com lesões, e tendo em conta as recomendações da DGAV dispostas no Anexo VI, seria de esperar que os resultados estivessem divididos em dois grupos, o dos animais com uma região afectada e o dos animais com 2 ou mais regiões afectadas sendo que estes seriam todos declarados impróprios para consumo humano. Todos os animais com 4 ou mais regiões afectadas foram declarados impróprios para consumo humano. Ocorreram aprovações de carcaças de animais com 2 e 3 regiões afectadas, ainda que em percentagens reduzidas.

Dos animais que apresentaram apenas 1 região afectada, 12% foram considerados impróprios para consumo humano, e tal como dito anteriormente, deve-se ao facto de a tuberculose bovina ser uma doença crónica e repercutir-se de outras formas como magreza extrema e emaciação das carcaças e não apenas como lesões caseosas em órgãos internos, o

que poderá justificar a rejeição das carcaças destes animais (Tizard, 2002; Coetzer & Tustin, 2004).

4.2- Informação Referente aos Animais

4.2.1- Idade

A idade é um factor de risco pelo simples facto de que os animais mais velhos terem potencialmente maior tempo de exposição ao agente, logo uma maior probabilidade de serem infectados (Radostits *et al.*, 2000). No entanto, os animais podem infectar-se em idades precoces expressando clinicamente a doença mais tarde, em idade adulta, pois as micobactérias têm a capacidade de se manterem num estado de latência durante longos períodos até se reactivarem em idades mais avançadas. Contudo, com os estudos realizados, ainda não foi possível concluir da existência de um verdadeiro estado de latência associado ao agente da tuberculose bovina (Humblet *et al.*, 2009).

Neste estudo composto por 523 animais, dos quais 9 se desconhecia a idade, a idade média dos animais situou-se nos 6,7 anos, sendo que o animal mais novo tinha 2 meses e o mais velho tinha 18 anos e 2 meses. Em todos os grupos etários predominaram casos com apenas uma única lesão, principalmente nos grupos etários mais novos. Nos grupos etários mais velhos a diferença entre os casos com uma lesão e os casos com duas lesões vai diminuindo gradualmente. A mesma situação se verifica aquando da distribuição do número de regiões afectadas pelos diversos grupos etários.

O predomínio em todos os grupos etários dos casos com apenas uma lesão, ou com apenas uma região afectada, deve-se principalmente ao facto de Portugal se encontrar numa fase de pré-erradicação da tuberculose bovina, com rastreios frequentes que permitem detectar os infectados em fases não muito avançadas da doença, reduzindo a propagação de lesões pelos diversos órgãos do organismo (DGAV, 2012a). O facto de os grupos etários mais velhos apresentarem diferenças substancialmente inferiores entre os casos de lesão única e números de lesão superiores deve-se à idade avançada desses animais, que se resume em maior tempo de exposição ao agente da tuberculose bovina, e consequentemente mais tempo para as lesões primárias se disseminarem para outros locais do organismo (Radostits *et al.*, 2000).

Constata-se que os resultados deste estudo confirmam o que é descrito por Radostitis *et al.* (2000) relativo à idade ser um factor de risco, pois conforme a linha de tendência nos indica, o número médio de lesões foi aumentando conforme o aumento da idade dos animais.

4.2.2- Sexo

Neste estudo os animais do sexo masculino representaram 11,5% e os animais do sexo feminino representaram 88,5%. O género não é um factor de risco associado ao desenvolvimento de tuberculose bovina, apenas alguns estudos realizados em países africanos o mencionam como tal (Humblet *et al.*, 2009). Segundo Humblet *et al.* (2009) um estudo conduzido na Tanzânia, refere os machos como sendo mais susceptíveis de desenvolver tuberculose bovina, mas neste país os machos são utilizados como animais de trabalho e têm um período de vida mais longo, logo são mais expostos ao agente da tuberculose bovina. Noutro estudo realizado no Uganda, o teste intradérmico da tuberculina revelou significativamente mais fêmeas. Assim, acredita-se que diferenças estatísticas entre os dois géneros estão relacionadas com os diversos tipos de manejo aplicados pelos diferentes países, pois o manejo das fêmeas é diferente do manejo dos machos, quer em países desenvolvidos quer em países em vias de desenvolvimento (Humblet *et al.*, 2009).

Em Portugal os animais do sexo masculino são destinados maioritariamente à engorda, apenas alguns animais com elevado valor genético são destinados a reprodução e o plano nacional de controlo e erradicação da tuberculose bovina não prevê o teste da IDTC em explorações de engorda, daí que neste estudo os bovinos do sexo masculino estejam presentes em menor percentagem do que os bovinos do sexo feminino, pois apesar de algumas fêmeas terem como destino as engordas, muitas outras são mantidas nas explorações para reprodução.

Analisando as figura 17 e 18 relativas à distribuição do número de lesões pelo sexo dos animais e da distribuição do número de regiões afectadas pelo sexo dos animais, respectivamente, é possível confirmar que as percentagens de animais do sexo masculino e de animais do sexo feminino estiveram sempre próximas das percentagens da sua representatividade na amostra, 11,5% no caso dos machos e 88,5% no caso das fêmeas. A única excepção foi no grupo de animais com 5 regiões com lesões, onde se registou 1 macho e uma fêmea, mas o número de casos não é suficiente para ter alguma relevância estatística.

4.2.3- Raça

Dos 515 animais com a informação referente à raça conhecida, 388 (75,3%) eram pertencentes à raça “Cruzada de carne” (33,6%), Maronesa (26,2%) e Mirandesa (15,5%). Considerando o efectivo bovino português que é sujeito ao teste da IDTC, a elevada ocorrência neste estudo de animais com raça denominada “Cruzada de carne” não é surpreendente atendendo a que esta raça é a mais utilizada nas vacadas de explorações extensivas, que têm como objectivo a produção de vitelos com aptidão para carne, devido ao facto de estas vacas possuírem boas características genéticas para a produção de carne e ao mesmo tempo serem animais resistentes e melhor adaptados ao terreno, quando comparados com animais de raça pura. Estes animais resultam normalmente do cruzamento com touros de raças puras com aptidão para carne, originando as crias que são destinadas às engordas (Santos, 2007).

Por outro lado, a elevada ocorrência neste estudo de animais de raça Maronesa e de raça Mirandesa é relevante. Estas duas raças autóctones representam 41,7% dos animais presentes neste trabalho. Segundo dados do SNIRA, tanto a raça Maronesa como a raça Mirandesa representam 0,6% do efectivo nacional, ou seja, as duas compreendem cerca de 1,2% do efectivo nacional bovino. Existem provas consideráveis de uma componente genética na resistência à tuberculose, contudo ainda não foi possível identificar os genes implicados na sua susceptibilidade (Allen *et al.*, 2010; Driscoll *et al.*, 2011; Humblet *et al.*, 2009). Na Índia e no Uganda nos anos trinta foi apontado o gado zebu como sendo uma raça mais resistente quando comparado a outras raças (Humblet *et al.*, 2009). Acredita-se que estas diferenças possam estar relacionadas com o manejo aplicado aos animais, sendo necessários outros estudos para confirmar a raça como sendo um factor de risco. Alguns autores sugerem ainda que existe a necessidade de se realizarem também estudos que avaliem se os testes intradérmicos têm o mesmo impacto em todas as raças, ou se existe a necessidade de se realizarem diferentes testes conforme a raça do animal em questão (Allen *et al.*, 2010; Driscoll *et al.*, 2011; Humblet *et al.*, 2009).

Sendo que a susceptibilidade genética à tuberculose das raças autóctones portuguesas nunca foi estudada, a apreciação destes resultados fica limitada ao tipo de manejo a que estes animais são expostos. Na realidade os animais das raças Mirandesa e Maronesa estão maioritariamente situados na região norte do país, em explorações familiares onde o número de animais é limitado. Nessas regiões as rotinas de pastoreio são muito propícias à propagação

de doenças infecciosas, pois existe pastoreio de animais de explorações diferentes nos mesmos terrenos e muitas vezes em simultâneo; existe ainda o abeberamento dos animais em bebedouros públicos destinados para esse efeito; os animais cruzam-se vulgarmente e sem controlo nos pastos podendo ainda contactar mais facilmente com animais silváticos visto não estarem estabulados a tempo inteiro, como acontece nas explorações de regime intensivo. Por todas estas razões, é plausível afirmar-se que o manejo aplicado nestas raças particulares pode contribuir largamente para os resultados encontrados neste estudo. Contudo, a possibilidade de existir susceptibilidade genética não pode ser posta de parte, até porque existem outras raças no país sujeitas a maneios semelhantes e que não se destacaram neste estudo. Tendo em conta a pertinência da questão e os resultados obtidos neste estudo são necessários futuros trabalhos no intuito de avaliar a susceptibilidade genética das diferentes raças à tuberculose bovina.

Tal como referido anteriormente, a raça “Cruzada de carne” apresentou uma ocorrência elevada (33,6%), mas em termos de lesões foi menos representativa (24,9%). Contrariamente, a raça Maronesa representou apenas 26,2% dos animais, mas em termos de lesões representou 40,4% das mesmas. Isto significa que o número médio de lesões dos animais da raça “Cruzada de carne” foi inferior (1,67) ao número médio de lesões dos animais da raça Maronesa (3,47). A raça Mirandesa apresentou valores semelhantes no que à sua prevalência no número de animais e no número de lesões diz respeito.

Estes resultados reforçam a necessidade de se estudar as eventuais particularidades das raças de bovinos referentes à susceptibilidade à tuberculose bovina.

5- CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho constatarem-se diversos factos, os quais despertaram algumas dúvidas e para as quais foram sugeridas algumas possibilidades. Trabalhos futuros serão de extrema importância quer numa abordagem geral, para se poderem comparar resultados, quer numa abordagem mais particular e específica que vise responder a questões mais específicas, tais como: serão as espécies silváticas as principais introdutoras da tuberculose nas explorações domésticas de bovinos das diversas regiões do território português, se sim, quais e de que modo o fazem; estará a prova IDTC a ser correctamente aplicada e lida nos efectivos das diversas explorações sem que interesses pessoais assumam a liderança.

Relativamente ao presente estudo, é de salientar a sua natureza original, bem como a sua pertinência, dado que se verificou, durante a elaboração desta dissertação, a falta de estudos similares ao apresentado, sendo que os que existem foram realizados já há vários anos, não representado de forma fidedigna a realidade actual. A tuberculose foi muito estudada na sua componente humana, mas nos bovinos ainda existe muito por aprofundar, sendo interessante estudar os casos de tuberculose em animais jovens, perceber se existe um género mais susceptível por si só à doença assim como encontrar uma raça geneticamente resistente.

Os resultados obtidos neste estudo permitem chegar às seguintes conclusões:

- A maior parte dos animais que revelam lesões de tuberculose na inspecção *post mortem*, expressam-nas ao nível da árvore respiratória e seus linfonodos, sendo muito importante o procedimento de inspecção em si, o qual deve ser metódico e detalhado
- Em Portugal existe um PE que já perdura há longos anos, contribuindo para a rápida detecção de animais infectados que aquando do abate sanitário manifestam um baixo número de lesões, as quais maioritariamente pertencem à mesma região anatómica.
- Quando um animal infectado com tuberculose é inspeccionado e apresenta lesões no sistema respiratório ou seus linfonodos associados, cria-se a necessidade de descartar a possível disseminação da doença por outros sistemas, a qual manifesta-se na grande parte das vezes no aparelho digestivo e seus linfonodos, devido à ingestão de exsudados contaminados provenientes das vias respiratórias.
- A maior parte dos animais submetidos a abate sanitário em Portugal são do sexo feminino e são de raça cruzada com aptidão para carne, de raça Maronesa e de raça Mirandesa.

No que diz respeito ao PE Portugal, este encontra-se na recta final, numa fase difícil e que requer um grande esforço e envolvimento de todas as entidades participantes, por forma a minimizar os erros e neutralizar os possíveis focos emergentes de doença da maneira mais célere. Assim, a inspecção sanitária rigorosa constitui uma ferramenta essencial para o sucesso na erradicação da tuberculose bovina em Portugal, pois permite detectar novos focos de doença através dos IE que são realizados após o aparecimento de um novo caso em matadouro.

BIBLIOGRAFIA

Abubakar, U. B., Shehu, S. A. & Mohammed, F. U. (2011). Retrospective Study of Tuberculosis in Slaughtered Cattle at Maiduguri Abattoir, Nigeria, *Vet Res*, 4, 1-4.

Alfonso L. (2007). Respiratory System. In McGavin, M. D. & Zachary, J. F., *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (4^a ed., pp.534, 526-527). Mosby Elsevier.

Allen, A. R., Minozzi, G., Glass, E. J., Skuce, R. A., McDowell, S. W. J., Woolliams, J. A., *et al.* (2010). Bovine tuberculosis: the genetic basis of host susceptibility, *Proc. R. Soc.B*, 277, 2737-2745.

Aranaz, A., Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., *et al.* (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol*, 42 (6), 2602-2608.

Biberstein, E.L. & Hirsh, D.C. (2004). *Mycobacterium*. In Hirsh, D.C., MacLachlan, N. J. & Walker, R. L., *Veterinary microbiology* (2^a ed., pp. 223-234). Blackwell Publishing.

Coetzer, J. A. W. & Tustin, R. C. (2004). *Infectious Diseases of Livestock* (2^a ed., vol. 3, pp. 1965-1969, 1973-1987). Oxford Southern Africa.

Comissão Europeia (2011). *Bovine and swine diseases*, Relatório Anual, 2011.

Corner, L. A. (1994). *Post mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle*. *Vet Microbiol*, 40, 53-63.

Corner, L. A. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Vet Microbiol*, 112, 303-312.

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglion, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., *et al.* (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis*, 4(1), 59-70.

de Kantor, I.N. & Ritacco, V. (2006). An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol*, 112, 111-118.

Direcção de Serviços de Higiene Pública Veterinária (2011). *Ofício – Circular nº16 de 1 de Fevereiro de 2011*.

DGAV - Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (2011). *Plano de Controlo e Erradicação da Tuberculose em Caça Maior*.

DGAV - Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (2012a). *Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina 2013: Portugal*.

DGAV – Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (2012b). *Programa de vigilância da tuberculose bovina (TB) na região do Algarve Reconhecida como Região Oficialmente Indemne de TB, Plurianual 2012-2015*.

DGAV - Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (2013). *Relatórios técnicos anuais de 2012 sobre os programas de erradicação*.

DGV - Direcção Geral de Veterinária (2011). *Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina 2012: Portugal*.

DGV - Direcção Geral de Veterinária (2012). *Relatórios técnicos anuais de 2011 sobre os programas de erradicação*.

Driscoll, E. E., Hoffman, J. I., Green, L. E., Medley, G. F., Amos, W. (2011). A Preliminary Study of Genetic Factors That Influence Susceptibility to Bovine Tuberculosis in the British Cattle Herd. (vol. 6, pp. 188-186).

EFSA - European Food Safety Authority (2013). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011*. Disponível on-line. Acedido a 14 de Agosto de 2013 em www.efsa.europa.eu

Ferreira, A. J. & Ferreira, C. (1990). *Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos* (4ª ed., pp.60-97). Fundação Calouste Gulbenkian.

Fonseca, A. P. (2011). *Problemática da tuberculose em ungulados domésticos e selvagens*. Moura, Portugal. Disponível on-line. Acedido a 22 de Outubro de 2013 em <http://www.icnf.pt/portal/caca/resource/doc/tuberc/ung-dom-selv>

Gordejo, F.J. & Vermeersch, J.P. (2006). Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet Microbiol*, 112, 101–109.

Hubbert, W. T., McCulloch, W. F. & Schnurrenberger, P. R. (1975). *Diseases Transmitted from Animals to Man* (6ª ed., pp. 303-304). Charles C Thomas Publisher.

Humblet, M. F., Boschioli, M. L. & Saegerman, C. (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach, *Vet Res*, 40-50.

Liebana, E., Johnson, L., Gough, J., Durr, P., Jahans, K., *et al.* (2008). Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Vet J*, 176, 354-360.

Mendoza, J. H., Parra, A., Tato, A., Alonso, J. M., Rey, J. M., Penã, J. *et al.* (2006). Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos Taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Prev Vet Med*, 74, 239-247.

Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J. & Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol*, 127, 1-9.

Neill, S. D., Bryson, D. G. & Pollock, J. M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle, *Tuberculosis*, 81, 79-86

Neill, S. D., Pollock, J. M., Bryson, D. B. & Hanna, J. (1994). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol*, 40, 41-52.

Olson, I., Barletta, R.G. & Thoen, C.O. (2010). Mycobacterium. In Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G. & Thoen, C. O., *Pathogenesis of bacterial infections in animals* (4^a ed., pp. 113-132). Iowa: Wiley-Blackwell.

Parra, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J. M. & 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.

Pires, M. A., Travassos, F. S. & Gärtner, F. (2004). Atlas de Patologia Veterinária (1^a ed., pp. 120). Lidel.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonar, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S. & Hartigan, P. J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2^a ed., pp. 250-261). Wiley-Blackwell.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C. & Hinchcliff, K. W. (2000). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses* (9^a ed., pp. 909-917). W. B. Saunders.

Rothschild, B. M., Martin, L. D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G. K., Greenblatt, C., *et al.* (2001). *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present. *Clin Infect Dis*, 33, 305-311.

Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H. & Clifton-Hadley, R.S. (2006). *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci*, 81, 190-210.

Santos, N. G. (2007). *A tuberculose no javali em Portugal*. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Snyder, P. W. (2007). Diseases of Inflammation. In McGavin, M. D. & Zachary, J. F., *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (4^a ed., pp. 221-225). Mosby Elsevier.

Tizard, I. R. (2002) *Imunologia Veterinária – Uma Introdução* (6^a ed., pp. 384-392) Roca.

Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Orloski, K., Nol, P., Harrington, N.P., Olsen, S. C. & Nonnecke, B.J. (2008). Blood culture and stimulation conditions for the diagnosis of tuberculosis in cervids by the Cervigam assay. *Vet Rec*, 162, 203-208.

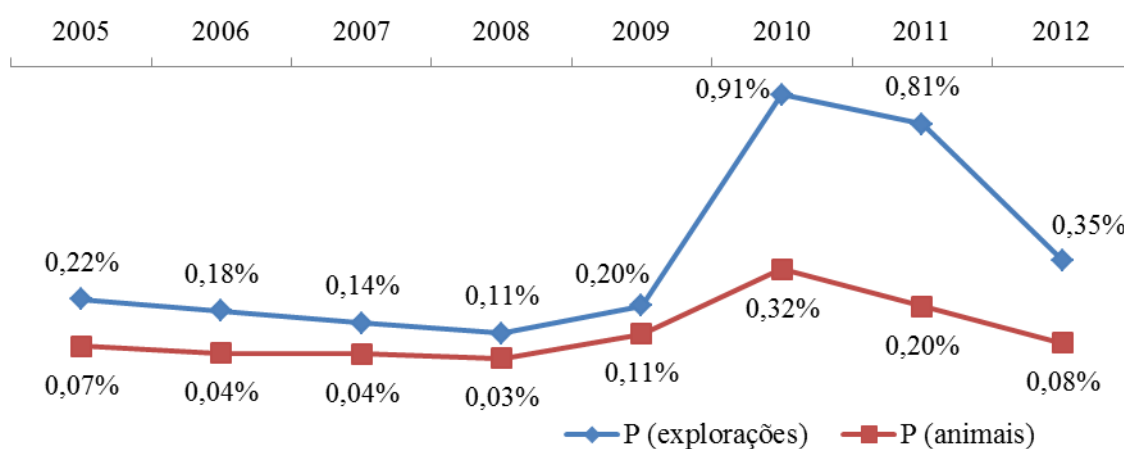
Whipple, D. L., Carole, A. B. & Janice, M. M. (1996). Distribution of Lesions in Cattle Infected with *Mycobacterium Bovis*. *J Vet Diagn Invest*, 8, 351-354.

Whipple, D.L. & Palmer, M.V. (2000). Reemergence of tuberculosis in animals in the United States. In Brown, C. & Bolin, C., *Emerging diseases of animals* (pp. 281-300). ASM Press.

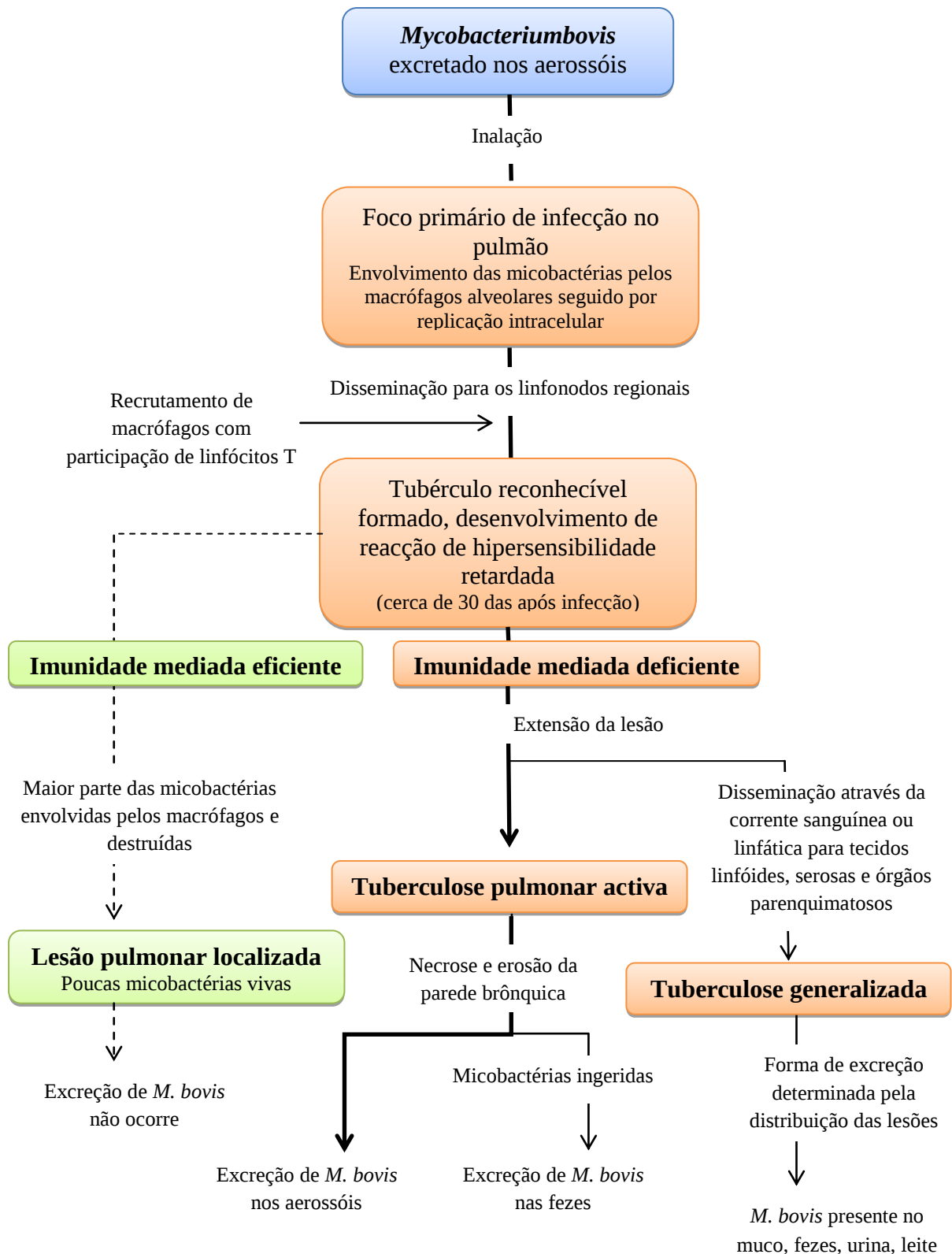
World Organisation for Animal Health (2013). *World animal health information database: Bovine Tuberculosis*. Disponível On-line. Acedido a 18 de Julho de 2013 em www.oie.in

APÊNDICES

Apêndice I – Tuberculose bovina: prevalência de explorações positivas e prevalência de animais positivos em Portugal de 2005 a 2012. Adaptado de DGV, 2011; DGV, 2012; DGAV, 2013.

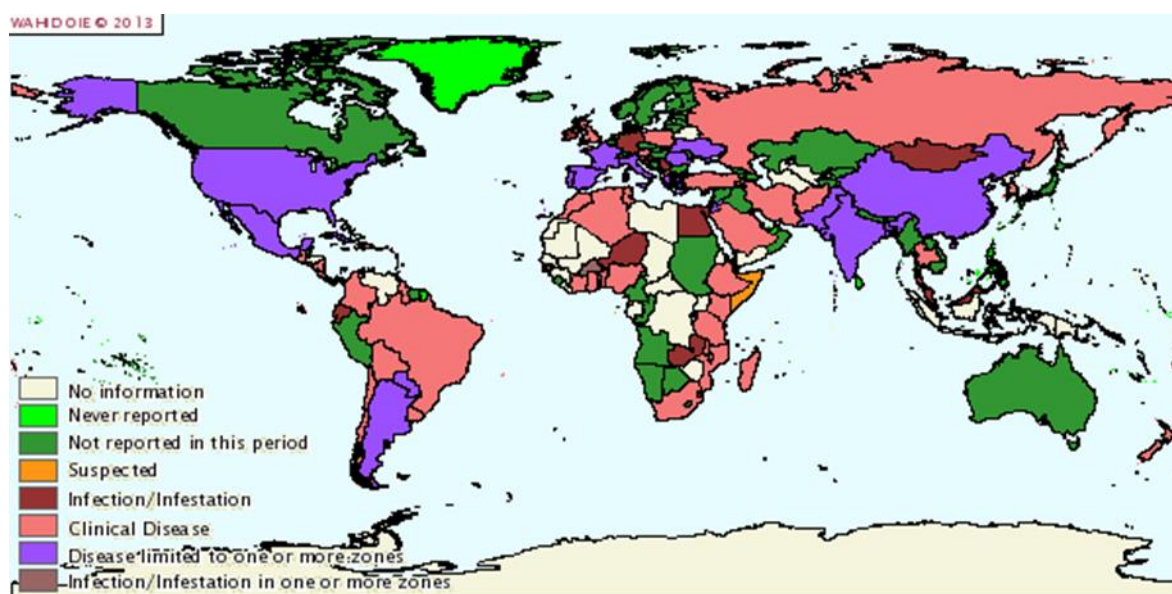


Apêndice II – Possíveis consequências da infecção por aerossóis com *M. bovis*.
Adaptado de Quinn *et al.*, 2011

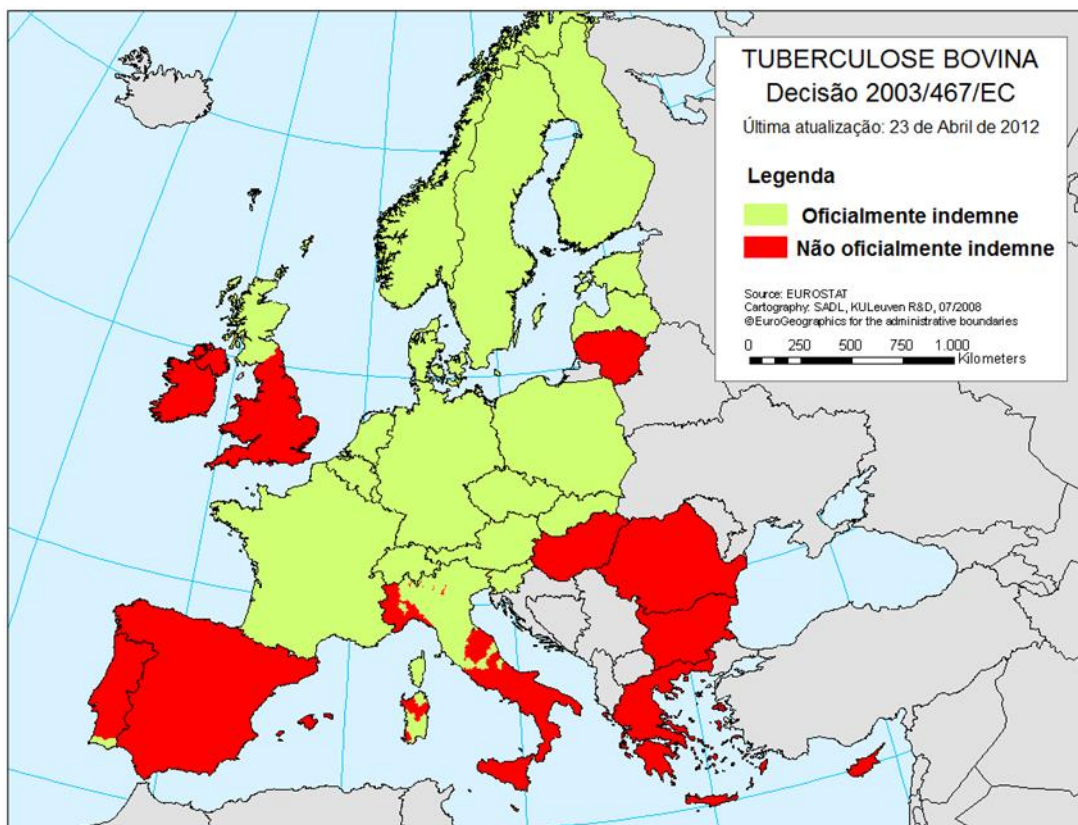


ANEXOS

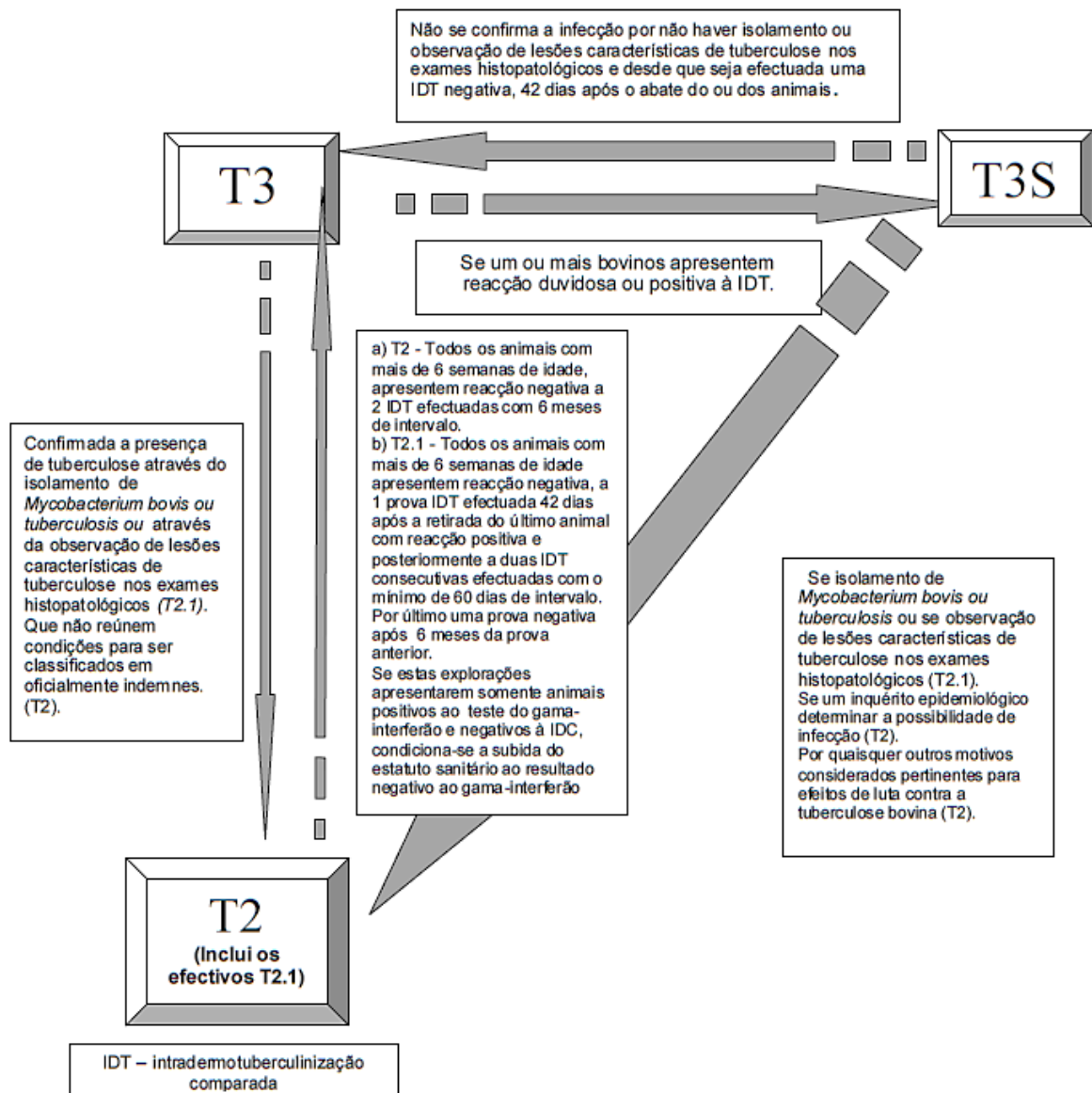
Anexo I – Mapa da distribuição da tuberculose bovina no mundo no período de Janeiro 2012 a Junho de 2012. Adaptado de World Organization for Animal Health, 2013.



Anexo II – Classificação actual dos países da UE (à excepção da Croácia que só faz parte desde 1 de Julho de 2013), Noruega e Suíça (não pertencem à UE mas são incluídos nos relatórios oficiais devido a acordos comerciais) relativamente à tuberculose bovina. Adaptado de Comissão Europeia, 2011.



Anexo III – Condições para a subida e descida de estatuto sanitário de um efectivo, de acordo com o PE. Adaptado de DGAV, 2012a.



Anexo IV – Indemnização recebida pelos proprietários dos bovinos submetidos a abate sanitário. Adaptado de DGAV, 2012a.

Indemnização por abate sanitário de bovinos

a) Valor base (carne) – peso de carcaça deduzido de 2% de enxugo, multiplicado pelo valor da indemnização (1,96€/Kg).

b) Aptidão da exploração (valor em €):

Categoria / aptidão	Leite	Carne / misto		
		Autóctone	Exótico	Cruzada
Vaca ≤ 6 anos	698,32	748,20	548,68	299,28
Vaca >6 ≤ 8 anos	349,16	498,80	374,10	224,46
Vaca >8 ≤ 10 anos	-	498,80	274,34	149,64
Bovino de trabalho até 6 anos (**)	-	748,20	-	-
Novilho > 20 meses	149,64	174,52	149,64	149,64
Novilho 12 a 20 meses	174,52	199,52	174,52	174,52
Novilha > 12 ≤ 18 meses	349,16	374,10	299,28	224,46
Novilha gestante (*)	423,98	448,92	374,10	299,28
Novilho 8 a 12 meses	199,52	224,46	199,52	199,52
Novilha 8 a 12 meses	249,40	274,34	224,46	224,46
Vitelo (a) 3 a 8 meses	124,70	149,64	124,70	124,70
Vitelo(a) até 3 meses	99,76	124,70	99,76	99,76

(*) Certificado pelo médico veterinário inspetor sanitário

(**) Certificado a emitir pela Direção de Serviços de Veterinária da Região, onde ateste que a única utilização é a produção de trabalho.

c) Valor zootécnico – os animais inscritos em livro genealógico ou registo zootécnico recebem ainda uma majoração de 15% sobre o montante a que se refere a alínea b), mediante apresentação de documentação comprovativa emitida pela entidade reconhecida.

Anexo V – Modelo de inspecção *post mortem* de abates sanitários de tuberculose bovina. Gentilmente cedido pelo Matadouro Regional de Maфра.

				Abate sanitário n.º		
Informações gerais						
Matadouro (nome e NCV)					Data	
Exploração origem		Nº guia trânsito/Decl. Deslocações		MVO (nome)		
Nº animais abatidos		Nº animais com lesões		MVO (n.º)		
Localização das lesões detectadas						
Identificação Animal						
Referência	C1	C2	C3	C4	C5	
	Marcar com X	Marcar com X	Marcar com X	Marcar com X	Marcar com X	
Linfonodos retrofaríngeos						
Linfonodos submaxilares						
Linfonodos parotídeos						
Pulmões						
Pleura						
Linfonodos brônquicos						
Linfonodos mediastínicos						
Tracto gastro-intestinal						
Linfonodos gástricos						
Linfonodos mesentéricos						
Baço						
Fígado						
Linfonodos hepáticos						
Rins						
Linfonodos renais						
Peritoneu						
Órgãos genitais						
Mama						
Linfonodos retro-mamários						
Outros						
Descrição das lesões detectadas (número, dimensão e aspecto) e outros aspectos relevantes (estado geral)						
C1						Decisão carnes
C2						Decisão carnes
C3						Decisão carnes
C4						Decisão carnes
C5						Decisão carnes

Anexo VI – Critérios de decisão no acto de inspecção veterinária em abates sanitários de tuberculose bovina (Direcção de Serviços de Higiene Pública Veterinária, 2011).

4. Atendendo ao exposto, o Veterinário Oficial, no decorrer das suas funções de inspecção sanitária, deve adoptar os seguintes critérios de decisão:

Estatuto da exploração	Resultado da prova de IDT	Lesões <i>post mortem</i>	Decisão
Positiva (T2.1)	Negativo	Não	Reprovação dos pulmões e do úbere Reprovação dos linfonodos inspeccionados Aprovação das restantes carnes
Qualquer	Positivo	Não	Reprovação das vísceras Reprovação dos linfonodos inspeccionados Aprovação da carcaça
Qualquer	Qualquer ^a	Localizadas em um único órgão ou parte da carcaça (e no linfonodo regional)	Reprovação da parte afectada Reprovação das vísceras Reprovação dos linfonodos inspeccionados Aprovação das restantes carnes
Qualquer	Qualquer	Miliares ou em vários órgãos ou partes da carcaça ou generalizada	Reprovação total

a) A aplicação do critério definido está dependente do resultado positivo no exame histopatológico, excepto se o animal for proveniente de uma exploração T2.1 ou tiver reagido positivamente à prova de IDT.