



EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE BOVINA



Fernando Boinas
FMV-UTL

Workshop sobre Tuberculose Bovina

DGV- Venda Nova

5 de Março de 2010

Estrutura da Apresentação

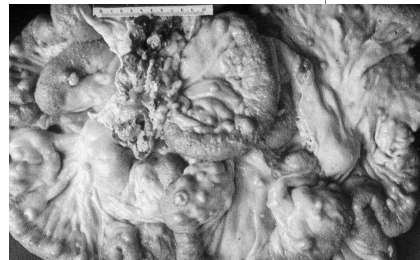
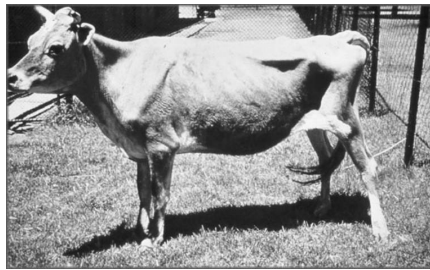
- ◉ Etiologia
- ◉ Distribuição
- ◉ Epidemiologia
- ◉ Diagnóstico
 - Clínico e lesional
 - Tuberculinização + estudo de casos
 - Interferão gama + estudo de casos
 - Diagnóstico cultural
 - Diagnóstico molecular + estudo de casos
- ◉ Controlo e Erradicação
- ◉ Investigação em Curso



TUBERCULOSE BOVINA

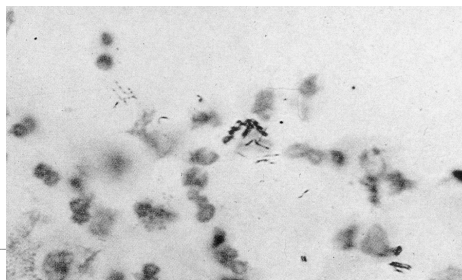
É uma doença contagiosa causada por **bactérias álcool-ácido-resistentes** do género *Mycobacterium*.

Normalmente apresenta-se como uma doença **crónica e debilitante** mas pode ocasionalmente apresentar-se com uma evolução **aguda**.



Etiologia

- ◎ *Mycobacterium bovis*
 - Nova espécie: *M. bovis* subsp. *caprae*
- ◎ *Mycobacterium tuberculosis*
- ◎ **Complexo *M. avium* - *intracellulare* - *scrofulaceum***



Distribuição de isolados de Mycobacterium em PT

HOSPEDEIRO	Nº DE ISOLADOS ESTUDADOS	ISOLADOS IDENTIFICADOS POR PCR-REA GYR B	
		<i>M. bovis</i>	<i>M. caprae</i>
Bovino	258	256	2
Caprino	8	1	7
Veado	21	21	0
Javali	6	5	1

F. Duarte, 2008

Susceptibilidade a micobactérias que causam tuberculose

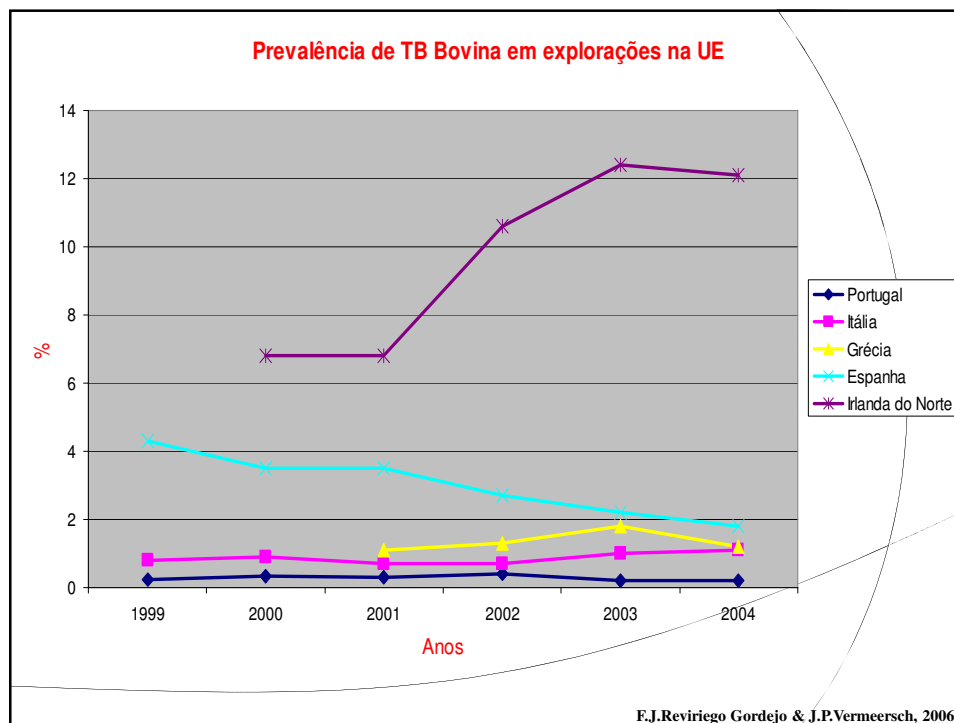
Espécie	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>
Primatas	+	+	-*
Bovinos	(+)	+	(+)
Ovinos e caprinos	-	+	(+)
Suínos	(+)	+	(+)
Equídeos	-	+	+ intestinal
Galináceos	-	-	+

+= susceptível, (+) ligeira/ susceptível ou podendo sensibilizar-se,

- = resistente á infecção, * Certos tipos podem ser patogénicos

Tuberculose bovina

- ⊙ Doença de Declaração Obrigatória
 - PT
 - EU
 - OIE
- ⊙ Programa de erradicação da tuberculose bovina em Portugal
 - Legislação Nacional
 - Legislação Comunitária
- ⊙ Doença emergente
 - Bovinos
 - Zoonose



TRANSMISSÃO

- ◉ Inalação: + (< 5 bacilos)
- ◉ Ingestão
 - pastos -água estagnada -18 dias
 - manjedouras
 - leite
- ◉ Intra-uterina
- ◉ Intra-mamária
- ◉ Outras espécies
- ◉ Carcaças de bovinos infectados -> suínos
- ◉ Sistemas de Produção



Avaliação da transmissão vertical de TB

		Expostos		
Não Expostos	Doença	+	-	Totais
	+	8	27	35
	-	34	1106	1121
	Totais	42	1114	1156

F.Menzies, 2006

Coortes de animais expostos (com mães infectadas com TB) e não expostos (nascidos na mesma exploração de mães sem diagnóstico de TB);

RR 1,2 (IC 95%, 0,8-1,79) e p=0,44 (NS))

EPIDEMIOLOGIA

◉ Hospedeiros de manutenção

- A infecção pode ser mantida numa população e transmitida às gerações seguintes dessa espécie e também a outros hospedeiros susceptíveis.
- *Bovinos, Búfalo Africano, Texugo, Opossum, Veado de cauda branca, Javali e Caprinos*



◉ Hospedeiros acidentais

- Podem ser susceptíveis à infecção com *M. bovis* e ficar doentes, mas a remoção da fonte de infecção resulta numa redução da prevalência da doença e a infecção não é mantida na população animal envolvida.
- *Suínos, Cães, gatos, Equinos e Ovinos, Javali e Caprinos*



ANIMAIS SELVAGENS – RESERVATÓRIOS

	Nova Zelândia	de Lisle, G.W., 1985
Veados (<i>Cervus elaphus</i>)	Inglaterra	Krebs, J., 1997
	Portugal	2002, ???
Hospedeiro silvático acidental de <i>M. bovis</i>		
	Itália	Schmitt, S.M., 1997
Javali (<i>Sus scrofa</i>)	Espanha	Aranaz, A., 1996
	Portugal	1999; ???



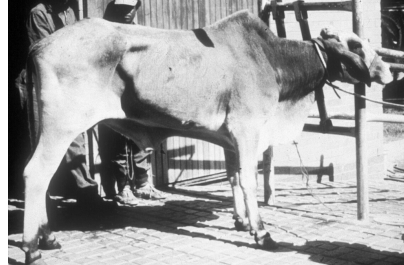
EPIDEMIOLOGIA

- ◎ **Espécies domésticas atingidas**
 - + Bovinos, caprinos e suínos
 - - Ovinos e equídeos
- ◎ **Fonte de infecção**
 - **Bovinos**
 - secreções e excreções - lesões abertas
 - a excreção é iniciada aos 90 dias post-infecção



DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LESIONAL

- ◉ Depende da extensão e localização das **lesões** e da consequente **toxémia**
 - Pulmão
 - Intestino
 - Mama
 - Útero
 - Linfonodos
 - Superficiais
 - Profundos



SINTOMAS

Bovinos

- ◉ **Emaciação** progressiva sem outros sinais
- ◉ **Apetite** caprichoso e **temperatura** ondulante
- ◉ **+ dóceis** e fracos mas os olhos permanecem alertas e brilhantes



SINTOMAS

Bovinos

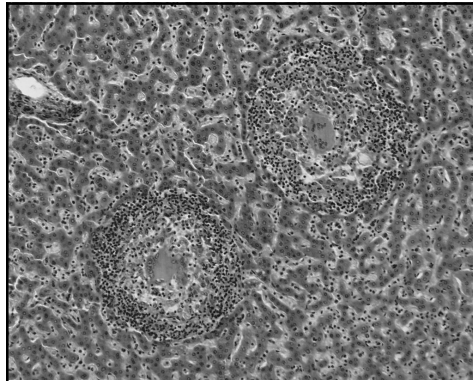
- ◉ **Pulmões** – Tosse intermitente, fraca, suprimida e gorda -> dispneia e taquipneia
- ◉ **Ln superficiais** - hipertrofia
- ◉ **Intestino** – diarreia rara; sintomas de obstrução por hipertrofia dos Ln
- ◉ **Útero** - metrite
- ◉ **Mastite** - Ln supramamários



LESÕES

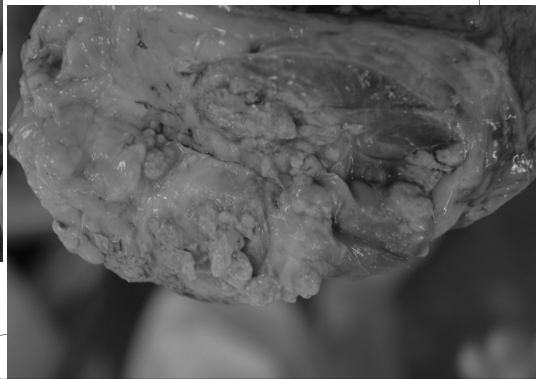
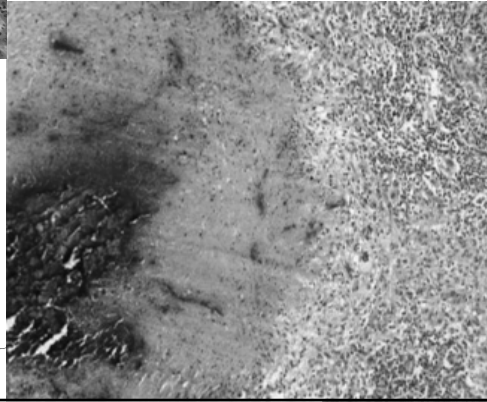
Bovinos, Ovinos e Caprinos

- ◉ **Ln** brônquicos, retrofaríngicos e mediastínicos com tubérculos
- ◉ **Pulmão** – tubérculos miliares -> pneumonia supurativa
- ◉ **Pleura e peritoneu** – Nódulos tuberculosos
- ◉ **Intestino** – pequenas úlceras + Ln
- ◉ **Tuberculose miliar** com hiperémia à volta das lesões e s/ c/ cápsula fibrosa variável
- ◉ **Lesões crónicas** – nodular com conteúdo caseoso espesso e com cápsula fibrosa grossa.



Histopatologia

C. Peleteiro, 2005

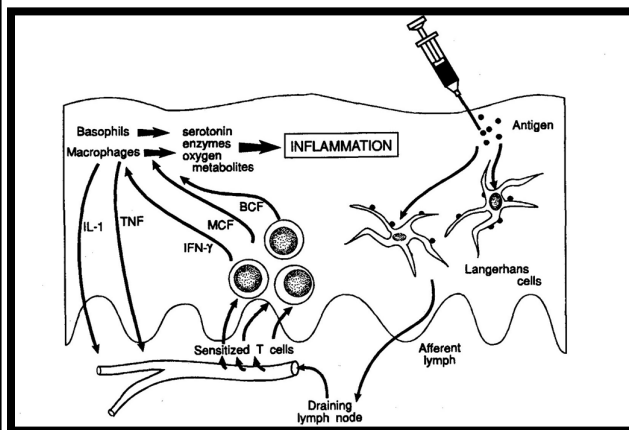


TUBERCULINIZAÇÃO

- ◉ **Teste comparativo**
- ◉ **Tuberculinas Aviária e Bovina - tipo PPD**
- ◉ **Inoculação intradérmica no terço médio da tábua do pescoço**
- ◉ **Leitura da reacção - 72 H**

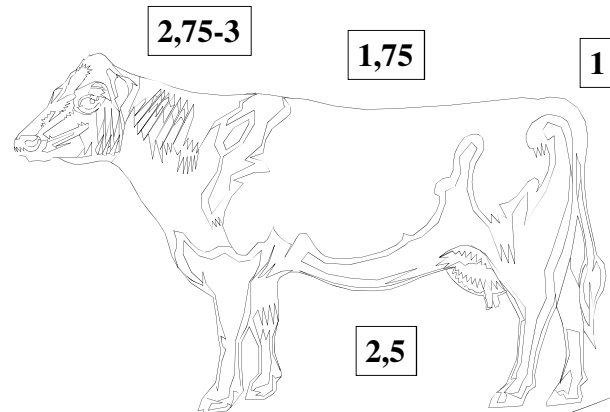


TUBERCULINIZAÇÃO - FUNDAMENTOS DE UM TESTE ALÉRGICO

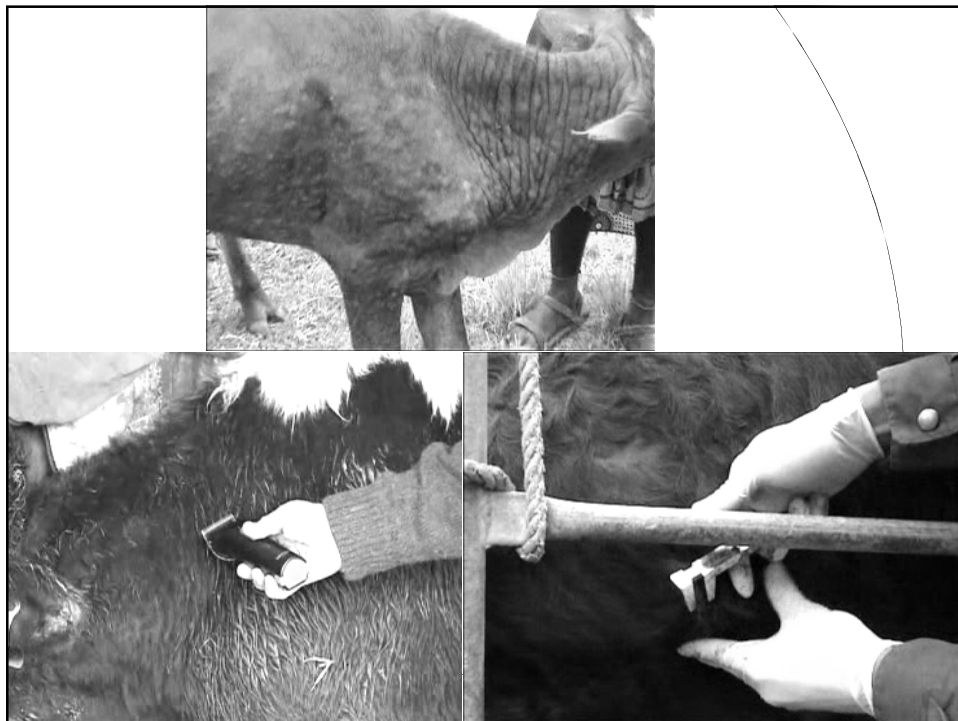


A estimulação com a PPD mamífera (bovina) e a PPD aviária, desencadeia (ou não) uma reacção de hipersensibilidade retardada de Tipo IV, com a formação de edema (reactopositivos) mensurável através de índices diferenciais às 72 horas.

Sensibilidade relativa à tuberculina dos diferentes locais da pele



Radostitis et al. 8th Ed, 1994





TUBERCULINIZAÇÃO

◉ CARACTERÍSTICAS DA REACÇÃO CUTÂNEA

- ◉ N - Nódulo
- ◉ ESP - Espessamento
- ◉ E.L. - Edema ligeiro
- ◉ E.C. - Edema circunscrito
- ◉ E.E. - Edema extenso
- ◉ E.D. - Edema difuso

◉ NECROSE COM FORMAÇÃO DE CROSTAS

- ◉ Dôr
- ◉ Linfangite
- ◉ Adenites (Ln. pré-escapular)



INTERPRETAÇÃO DAS REACÇÕES À TUBERCULINA -
DL 157/98 de 9 de Junho

<u>Reacção</u>	<u>Descrição</u>
Negativa	2mm de espessura sem sinais clínicos edema difuso ou extenso, exsudação, necrose, dor ou reacção inflamatória dos linfáticos da região ou dos gânglios.
Duvidosa*	nenhum sinal clínico superior a
Positiva	2mm e inferior a 4mm. observarem sinais clínicos 4 mm ou mais

***Os animais que apresentaram resultados duvidosos serão submetidos a uma tuberculinização após um período mínimo de 42 dias.**

INTREPRETAÇÃO DAS REACÇÕES À PROVA COMPARATIVA DA TUBERCULINA -
DL 157/98 de 9 de Junho

<u>Reacção</u>	<u>Descrição</u>
Negativa	Reacção bovina igual ou inferior a uma reacção aviária ausência de sinais clínicos*
Duvidosa**	tuberculina bovina positiva ou duvidosa e superior em 1 a 4mm à reacção aviária ausência de sinais clínicos*.
Positiva	tuberculina bovina superior a mais de 4mm à reacção à tuberculina aviária presença de sinais clínicos*.

*Sinais clínicos edema difuso ou extenso, exsudação, neecrose, dor
ou reacção inflamatória dos linfáticos da região ou dos gânglios.

**** Os animais que apresentaram resultados duvidosos serão submetidos a uma
tuberculinização após um período mínimo de 42 dias.**

Tuberculinização

REACÇÕES FALSO-POSITIVAS

- ⊙ Prova comparativa
- Infecção por *M. Tuberculosis* (temporário e ↓
patogénico)
- ⊙ Prova simples
- Heteroalergia geralmente temporária
- Infecção por micobactérias não patogénicas
- Paratuberculose (Bacilo de Johne)
- Lesões cutâneas com bactérias ácido-resistentes
(tuberculose cutânea)

Tuberculinização

REACÇÕES FALSO-NEGATIVAS (1/2)

Período de incubação (fase pré-alérgica – 3 a 6 sem. pi)

- Tuberculose avançada (anergia)
- Animais sob stress/ caquéticos/ doentes (BVD)
- Frequência da tuberculinização
- Imunodepressores
- Animais 4-6 semanas pós-parto (30%)
- Factores relacionados com:
 - Tuberculina
 - Método

Tuberculinização

REACÇÕES FALSO-NEGATIVAS (2/2)

- Factores relacionados com:
 - Tuberculina
 - Método

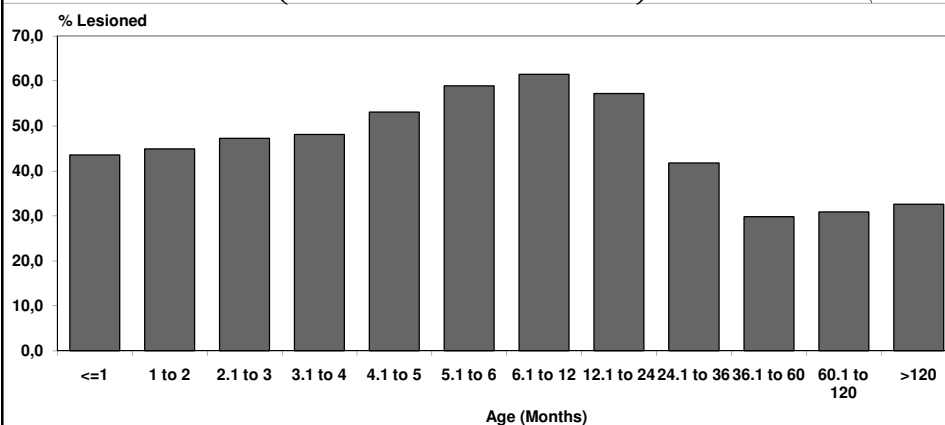
Teste Comparativo
Outras micobactérias
(Complexo *M. avium-intracellulare*) /
vacinação D. Johne



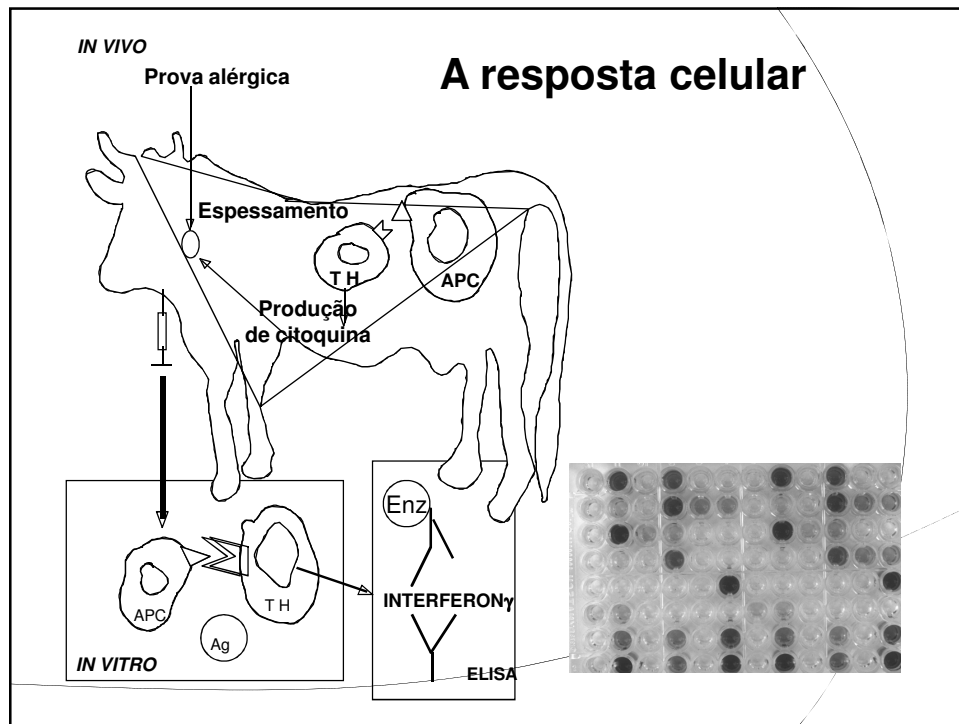
Comparação de testes de diagnóstico de tuberculose

Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Tuberculina	66-95	98-99
g-interferão	77-94	95-97
Serologia	baixa	baixa
Tuberculina+ g-interferão	95	

Ocorrência de lesões em bovinos reagentes à tuberculinização (Irlanda do Norte)



D. Abernethy, 2009



Interferão Gama

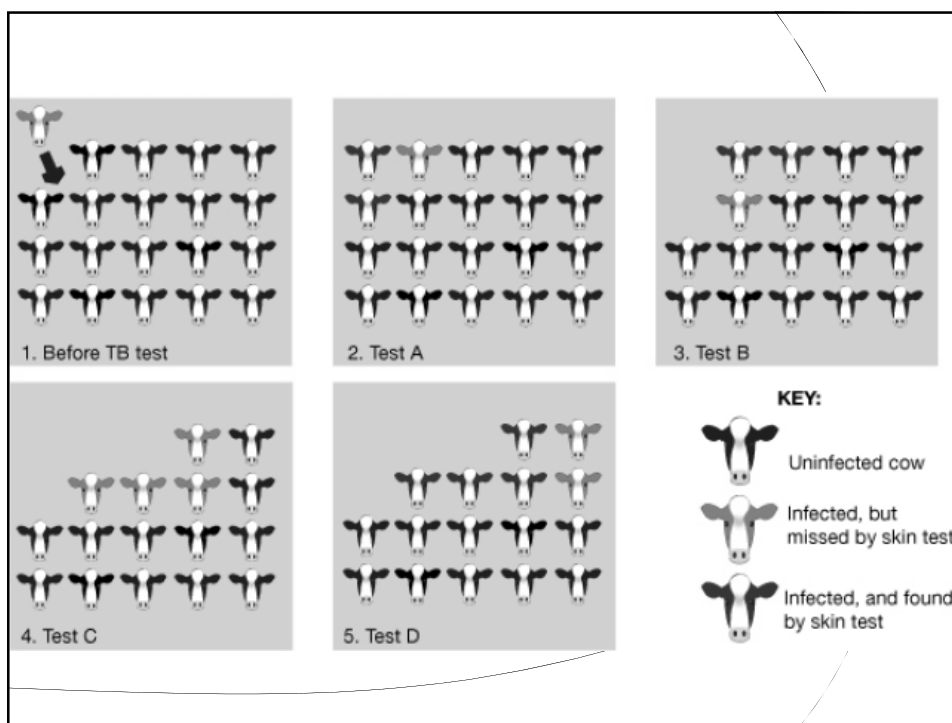
◉ VANTAGENS

- ◉ Rapidez - 24h.
- ◉ > sensibilidade -
 - Antecipação - 15-90 dias
- ◉ Método padronizado
- ◉ Sem período refratário (vs 42-60 d.) - t. paralelo
- ◉ CC
- ◉ Uma única contenção do animal

◉ DESVANTAGENS

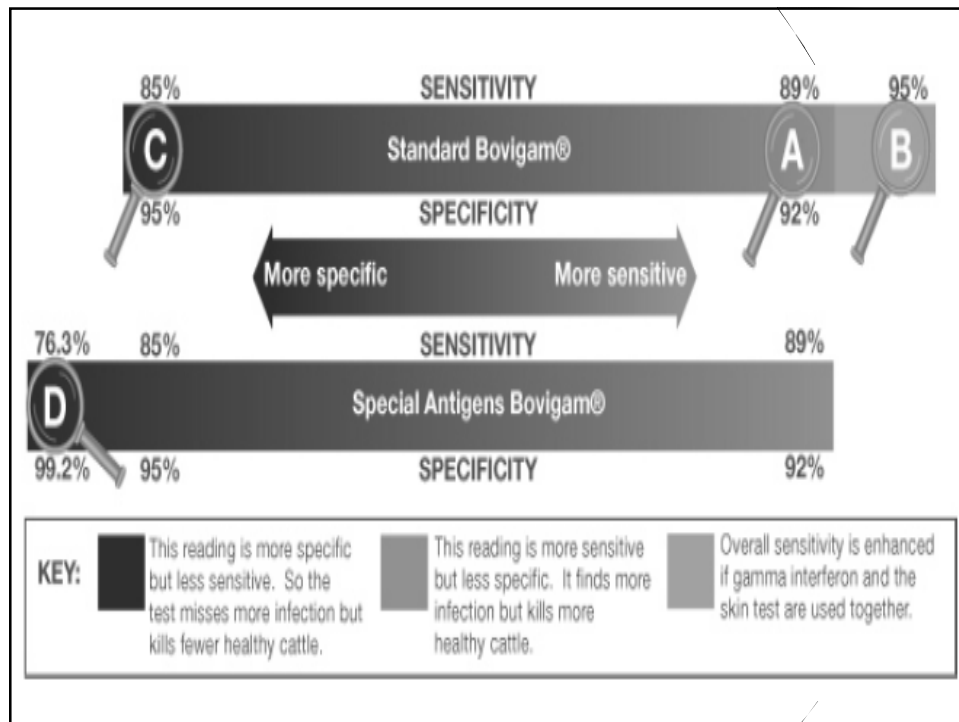
- ◉ Estimulação após 8 h.
- ◉ Custo elevado
- ◉ Resposta deprimida
 - Parto (4 sem.)
 - corticosteroides (1 sem.)





TUBERCULOSE BOVINA - ESTUDO DE CASOS

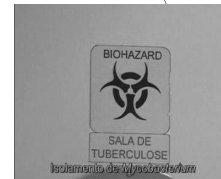
- ⊙ **EXPLORAÇÃO**
- ⊙ **Agosto 01:**
- ⊙ **Tuberculina +:** remoção de 4 animais
- ⊙ **Interferão – gamma:** + 24 / 200 bovinos
- ⊙ **10 c/ lesões pós-mortem**
- ⊙ **Outubro 01:** 14 bov. Tuberculina - / IF +
- ⊙ **Dezembro 01:** 4 bov. Tuberculina - / IF+
- ⊙ **Março 02:** Estatuto Livre
- ⊙ **Junho 02:** 2 IF inconclusivos (Utiliz de “Special antigen Bovigam”)

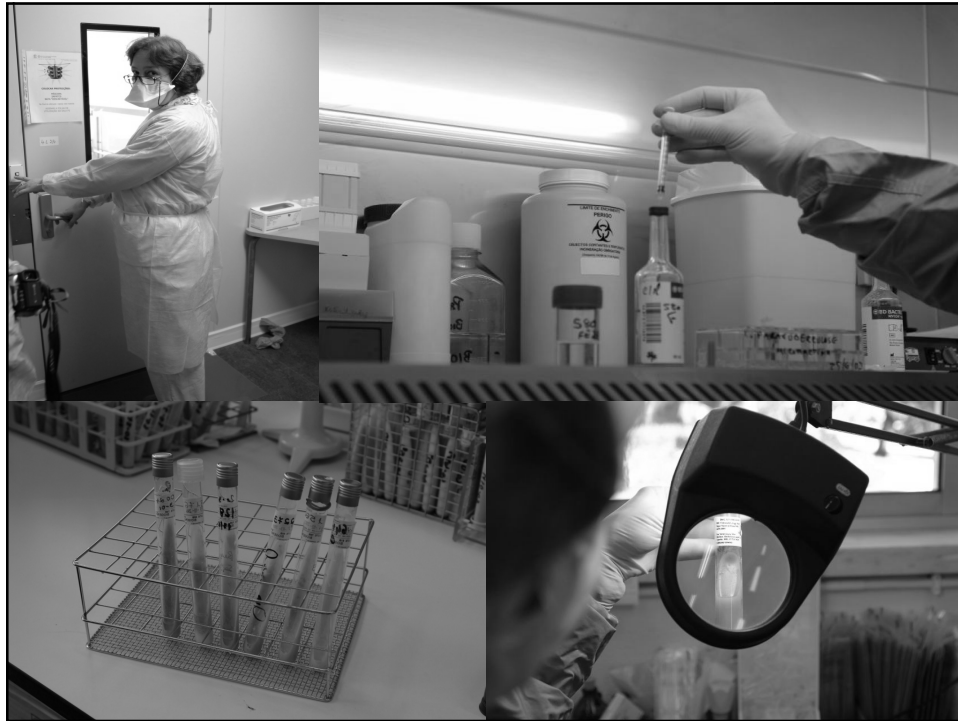


DIAGNÓSTICO

Identificação do agente

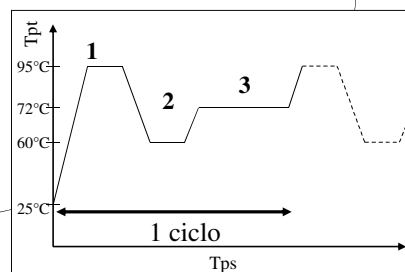
- Exame microscópico
 - Ziehl-Neelsen
 - Fluorescência
 - Imunoperoxidase
- Cultura de *Mycobacterium bovis*
 - Descontaminação, homogenização e centrifugação
 - Meio de isolamento sólido - Lowenstein-Jensen, Stonebrink e Middlebrook
 - Incubação a 37° C por um período mínimo de 8 semanas. *M. bovis* geralmente cresce após 3 a 5 semanas.
 - Meio de isolamento líquido - BACTEC 460TB - redução do PI para metade
 - Exame cultural e provas bioquímicas



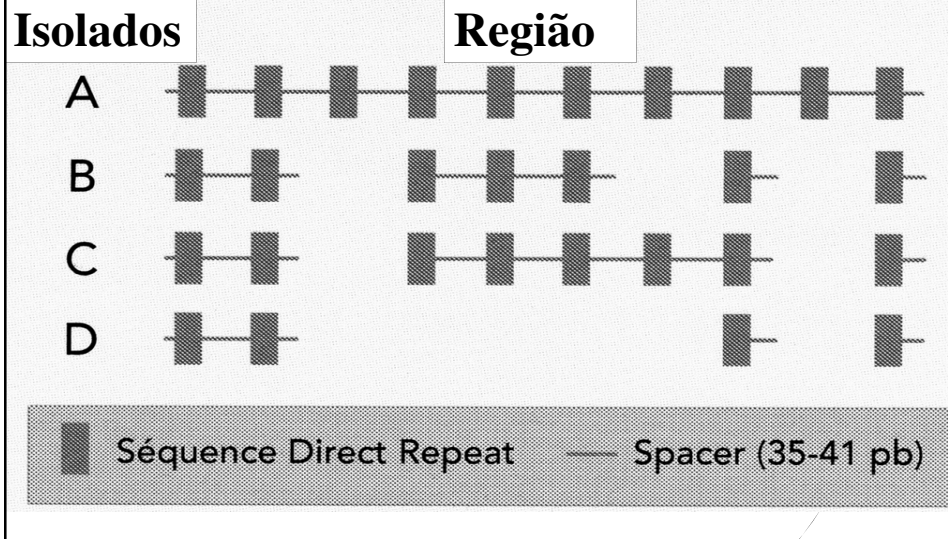


DIAGNÓSTICO

- ◉ Técnicas moleculares
 - Sondas de DNA / PCR – detecção de *M. bovis* não viável.
 - DNA fingerprinting
 - Spoligotipagem
 - RFLP – IS6110, DR, PGRS
- ◉ Testes laboratoriais ao sangue
 - **Gamma-interferon**
 - ELISA



Spoligotipagem de *Mycobacterium*



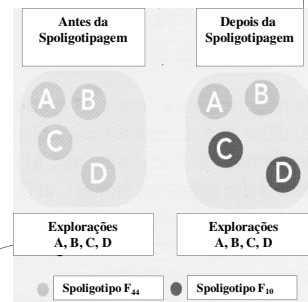
**TABLEAU 4 DISTRIBUTION DES ISOLATS
PAR ESPÈCE ANIMALE ET PAR SPOLIGOTYPE**

Spoligotype	Bovins	Caprins	Cervidés*	Zoo**	Comp***	Ovins	Porcins	Inconnu	Total
• BCG-like	329	13		1	6	1		6	356
• GB 54	121	1	24	5	2	2	1	3	159
• GB 35	81	1		1				3	86
• F 004	49	1	1		1				52
• F 040	2	14							16
• Autres	648	8	4	7	3			10	680
• Total	1230	38	29	14	12	3	1	22	1349

Problema 1 – Risco de vizinhança

Dados

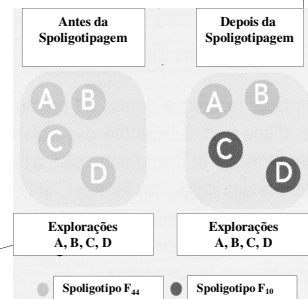
- 4 explorações vizinhas – A, B, C, D - declaradas infectadas
- C- touro abatido com lesões fechadas de TB
- Inquérito epidemiológico de C e D
 - Pastagem noutra povoação dt a estação anterior
 - D – o Touro C saltou (breve/) para as suas pastagens e cobriu 1 vitela



Problema 1 – Risco de vizinhança

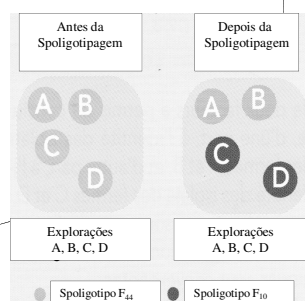
Dados

- Abate total da exploração C
- A vitela de D foi mantida em lote separado
 - IDC – única positiva
 - Abatida – lesão no In pre-escapular
 - Spoligotipagem = C



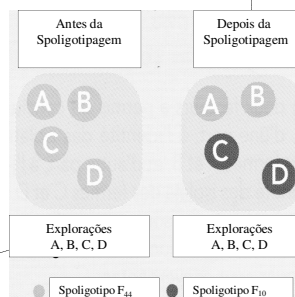
Problema 1 – Risco de vizinhança Síntese e Consequências

- ◉ 2 focos distintos
 - As explorações A e B – o spoligotipo raro F44
 - As explorações C e D – o spoligotipo raro F10



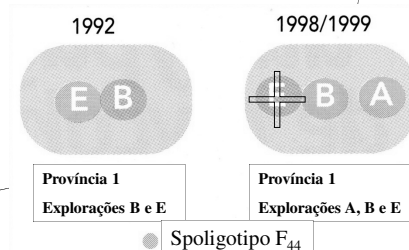
Problema 1 – Risco de vizinhança Síntese e Consequências

- ◉ **Determinação da causa da contaminação da D como o touro abatido -> não houve abate total**
 - **Declarações = dos 2 produtores**
 - **Curta duração da persistência do touro na expl. D**
 - **Poucos meses entre a contaminação e eliminação da vitela**
 - **Lesões**
 - **Touro – sem lesões abertas**
 - **Vitela - lesões exclusivamente gangl/**
- ◉ **Seguimento de D**
 - **Desinfecção das instalações**
 - **Lote mantido separado**
 - **Controlos IDC dt 5 anos**



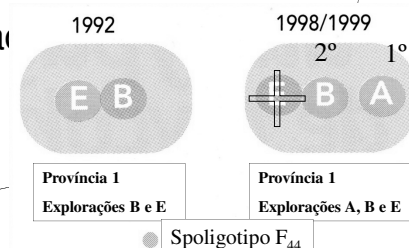
Problema 2 – Re-ocorrência após 7 anos

- ◉ Surgimento em 1998/99 de um foco em A e B
- ◉ E – spoligotipo F44 em 1992
- ◉ Partilha de pastagens em B e E (família)
- ◉ Abate total de E em 1992



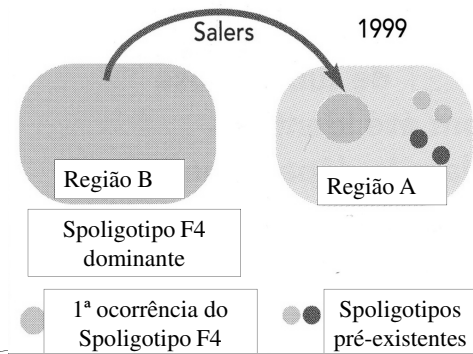
Problema 2 – Re-ocorrência após 7 anos

- ◉ Possível contaminação de B em 1992
 - ◉ Contaminação posterior de A
 - s/ + fontes de contaminação
 - ◉ A infecção persistiu inaparente em B dt anos c/ excreção do agente
- > o apareci/ de sinais clínicos foi + tardio que em A contamina posterior/.



Problema 3 – Introdução de um foco de outra Região

- ◉ Em 1999 o spoligotipo F4 apareceu pela primeira vez na Região A
- ◉ Aquisição de rebanho Salers na região B
- ◉ O spoligotipo F4 é dominante na região B
- ◉ Aparecimento 7 anos após a aquisição
 - longo PI
- ◉ Não se isolou na Região B
 - evidência circunstancial



Problema 4 – Limitações da tipificação molecular

- ◉ 2 rebanhos de ovinos tuberculosos
 - 12 km de distância
 - Identificados + poucos meses de intervalo
- ◉ Spoligotipo GB54
 - Mesmo nos 2 rebanhos
 - + frequente no país
- ◉ Sem ligação epidemiológica entre as 2 explorações



Problema 4 – Limitações da tipificação molecular

- ◉ Síntese
 - Impossível determinar a ligação – spoligotipo frequente
 - Associação com outras técnicas de tipificação - marcadores genéticos independentes
 - GB 54 é ubiqutário – grande espectro de hospedeiros
 - Cervídeos & javalis
 - Programa de epidemiovigilância das espécies domésticas – silváticas
 - Reservatório / acidental (fundo-de-saco)

Tipificação molecular na Tuberculose bovina

- ◉ Epidemiologia de rebanho
 - **Diferentes origens**
 - **2 isolados podem co-existir na mesma exploração**
 - **Isolados de fauna silvática**
 - **Determinação dos perfis dominantes num país**
 - **Caracterização por regiões**
 - **Realização de estudos filogenéticos**
 - **Perda de *spacers***
 - **História natural**
 - **Avaliação da bio-estabilidade**
 - **Identificar novas sub-espécies**
 - **Biodiversidade maior se a prevalência é reduzida**
 - ***M. caprae***

Tipificação molecular na Tuberculose humana

◉ Estudo comparativo – Australia 1999

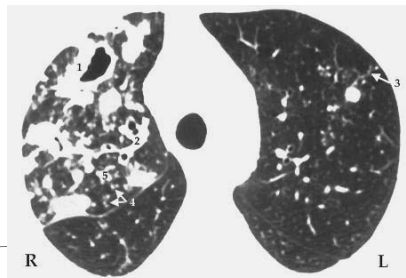
- Problema ocupacional (matadouros)
 - Mesmos marcadores moleculares em bov. & hu.
- Imigrantes
 - Isolados de *M.bovis* diferentes dos Australianos

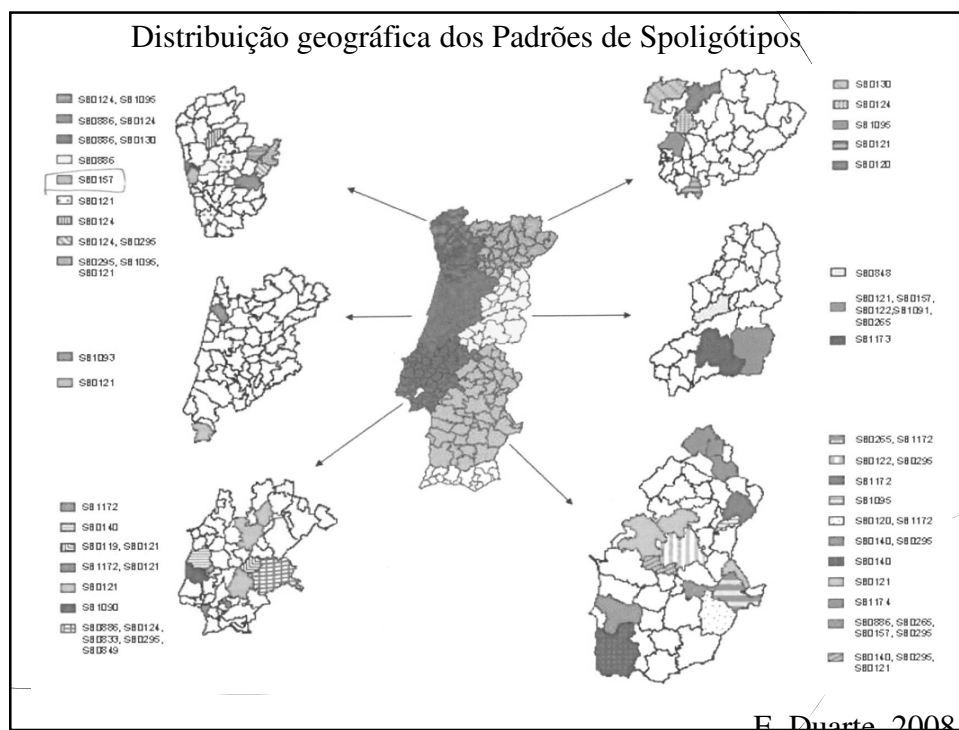


Tipificação molecular na Tuberculose humana

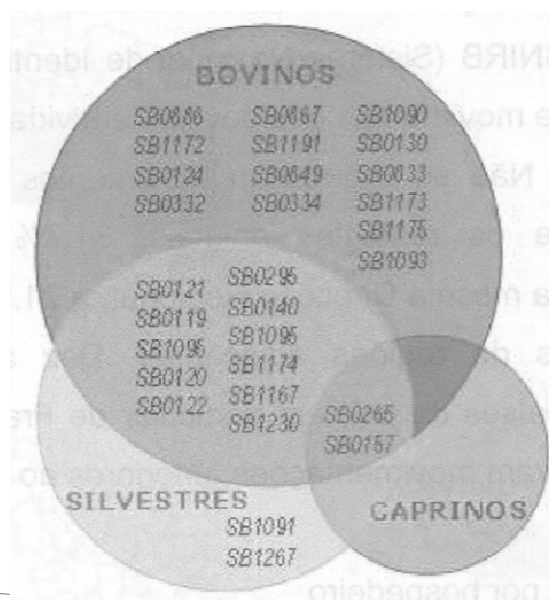
◉ Co-infecção com 2 isolados diferentes

- Tipificação de colônias da mesma cultura
- Re-isolamento após tratamento (*comparação de isolados antes e depois*)
 - Re-infecção
 - Resistência à terapêutica anti-tuberculosa





Partilha de diferentes padrões de spoligótipos entre Hospedeiros (PT)



Phylogenetic tree of the 16S rDNA sequences of *S. aureus* strains. The tree shows a scale bar of 0.1 and a list of 28 strains with their corresponding sequence logos. The strains are: SB1230, SB0140, SB1267, SB1172, SB0265, SB0848, SB1191, SB0295, SB1091, SB1174, SB1173, SB0121, SB1090, SB0124, SB1093, SB1095, SB0332, SB0334, SB0119, SB0122, SB0867, SB0130, SB0849, SB1167, SB0120, SB0833, SB0886, SB1175, and SB0157. The tree indicates that SB1175 and SB0157 are the most divergent strains, while the others form a large cluster.



GESTÃO CINEGÉTICA

