

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**REAÇÕES FALSO-NEGATIVAS AO TESTE CERVICAL
COMPARATIVO PARA TUBERCULOSE BOVINA**

RUDIELLE DE ARRUDA RODRIGUES

CAMPO GRANDE, MS

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**REAÇÕES FALSO-NEGATIVAS AO TESTE CERVICAL
COMPARATIVO PARA TUBERCULOSE BOVINA**

False-negative reactions to the comparative intradermal tuberculin
test for bovine tuberculosis

Rudielle de Arruda Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
como requisito à obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias.

CAMPO GRANDE, MS

2017



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Mestrado

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezessete, às oito horas, na Sala F da Pós-Graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Flávio Ribeiro de Araújo (Embrapa/CNPGC), Klaudia dos Santos Goncalves Jorge (UFMS) e Lenita Ramires dos Santos (EMBRAPA CNPGC), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **RUDIELLE DE ARRUDA RODRIGUES**, CPF 02366375174, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título **"REAÇÕES FALSO-NEGATIVAS AO TESTE CERVICAL COMPARATIVO PARA TUBERCULOSE BOVINA"** e orientação de Flávio Ribeiro de Araújo. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Flávio Ribeiro de Araújo
Dra. Klaudia dos Santos Goncalves Jorge
Dra. Lenita Ramires dos Santos
Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos (Suplente)

ASSINATURA

Flávio Araújo
Klaudia Jorge
Lenita R. Santos

AValiação

APROVADA
APROVADA
APROVADA

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Flávio Araújo
Presidente da Banca Examinadora

Rudielle Rodrigues
Aluna

*À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.
Especialmente aos meus pais, Élcio (in memoriam) e
Rose com todo meu amor e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo por todo ensinamento, dedicação e oportunidade.

À pesquisadora Profa. Dra. Lenita Ramires dos Santos da Embrapa Gado de Corte, pelas contribuições técnicas e científicas ao longo deste estudo.

À técnica do laboratório de Imunologia Aplicada da Embrapa Gado de Corte, Gisele Leguizamón por todo auxílio no laboratório, paciência e conhecimento compartilhado.

Às colegas do laboratório de Imunologia Aplicada da Embrapa Gado de Corte, Elaine Baez, Daniele Bier, Gisele Bacanelli, Ingrid Souza e Larissa Duarte pelo agradável convívio e apoio na execução de vários experimentos.

À Embrapa Gado de Corte por disponibilizar toda infraestrutura para a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aos professores pelos ensinamentos e dedicação, em especial ao Prof. Dr. Carlos A. N. Ramos e a Profa. Dra. Klaudia S. G. Jorge.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI/CNPQ/Universal (Processo: 443235/2014-7); FUNDECT/CNPq (TO: 085/2015) e Embrapa (Código SEG: 02.13.10.008.00.00) pelo financiamento deste trabalho.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

Resumo

RODRIGUES, R.A. Reações falso-negativas ao Teste Cervical Comparativo para tuberculose bovina. 2017. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

No Brasil, segundo o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os testes de rotina para o diagnóstico de tuberculose bovina são o teste cervical simples (TCC), o teste da prega caudal (TPC) e o teste cervical comparativo (TCC), sendo que o último também é utilizado como teste confirmatório. Um grupo de 53 animais oriundos de três rebanhos leiteiros de área de foco para tuberculose bovina que foram submetidos a vazio sanitário no Rio Grande do Sul foi submetido ao TCC. Os tecidos destes animais foram cultivados e as colônias resultantes confirmadas por PCR e sequenciamento de DNA. Dos 53 animais analisados no TCC, 32 (60,4%) foram negativos, 14 (26,4%) positivos e sete (13,2%) inconclusivos, com base no PNCEBT. O TCC detectou como positivos 11 dos 39 animais com infecção por *M. bovis* confirmada por cultivo. Do total de 14 animais não infectados, baseado na cultura, o TCC detectou oito como negativos. Assim, o TCC apresentou, para a população amostrada, sensibilidade de 28,2% e especificidade de 57,1%. Um total de 24/32 (75,0%) dos animais negativos ao TCC foi positivo no cultivo (confirmado por PCR), sendo considerados falso-negativos ao TCC. A manutenção destes animais falso-negativos nos rebanhos tem sérias implicações para o controle da enfermidade, já que os mesmos podem ser fonte de infecção. A adição de testes complementares poderia auxiliar na identificação destes animais, aumentando a cobertura diagnóstica.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*, Teste Cervical Comparativo, cultura bacteriológica.

Abstract

In Brazil, according to the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), the routine tests for the diagnosis of bovine tuberculosis (bTB) are the simple intradermal tuberculin test (SITT), the caudal fold test (CFT) and the comparative intradermal tuberculin test (CITT). The latter is also used as a confirmatory test. A group of 53 animals from three dairy herds of an outbreak area for bTB that were submitted to depopulation in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, were submitted to CITT. The tissues of these animals were cultured and the resulting colonies confirmed by PCR and DNA sequencing. Of the 53 animals analyzed in the CITT, 32 (60.4%) were negative, 14 (26.4%) positive and seven (13.2%) inconclusive. The CITT detected 11 out of the 39 animals with culture-confirmed *M. bovis* infection as positive. From the total of 14 uninfected animals, based on culture, the CITT detected eight as negative. Thus, the CITT showed a sensitivity of 28.2% and a specificity of 57.1% for the sampled population. A total of 24/32 (75.0%) of the animals negative to CITT were culture positive (confirmed by PCR) and were considered false negative. The maintenance of these false-negative animals in the herds has serious implications for the control of the disease, since they can be a source of infection. The addition of complementary tests could help to identify these animals, increasing the diagnostic coverage.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, Cervical Comparative Tuberculin Test, bacteriological culture.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Etiologia	13
3.2 Micobactérias ambientais	14
3.3 Importância econômica	16
3.4 Cadeia epidemiológica	17
3.5 Distribuição geográfica	20
3.6 Imunopatogenia	22
3.7 Métodos de diagnóstico direto	24
3.7.1. Diagnóstico anatomopatológico	24
3.7.2 Diagnóstico bacteriológico	26
3.7.3 Diagnóstico histopatológico	27
3.7.4 Diagnóstico molecular	28
3.8 Métodos de diagnóstico indireto	31
3.8.1 Teste intradérmico	31
3.8.2 Teste de interferon-gama (IFN- γ)	36
3.8.3 Testes sorológicos	38
3.9 Pesquisas por novos antígenos	42
REFERÊNCIAS	45
REAÇÕES FALSO-NEGATIVAS AO TESTE CERVICAL COMPARATIVO PARA TUBERCULOSE BOVINA	56
ABSTRACT	56
RESUMO	57
INTRODUÇÃO	57
MATERIAL E MÉTODOS	58
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO	60
REFERÊNCIAS	62

CONSIDERAÇÕES FINAIS65

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma enfermidade infecciosa de evolução crônica, causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium bovis*, que acomete muitas espécies domésticas e silvestres, principalmente bovinos e bubalinos, além de causar doença nos humanos (MICHEL et al., 2010; ETCHECHOURY et al., 2010; OIE, 2015). A doença representa uma ameaça à saúde pública e causa perdas econômicas à pecuária, principalmente devido à eliminação dos bovinos infectados (ABRAHÃO et al., 2005; BENNETT; COOKE, 2006; SA'IDU et al., 2015). Além disso, a presença da doença nos rebanhos implica em barreira comercial à exportação de carne (BRASIL, 2012).

O método padrão utilizado em vários países para diagnosticar a tuberculose bovina é o teste intradérmico, que consiste na detecção de hipersensibilidade tardia após a inoculação de antígeno micobacteriano, denominado derivado proteico purificado (PPD) (OIE, 2015).

Embora o teste intradérmico seja o método recomendado para o diagnóstico de animais infectados com *M. bovis*, nem todos os animais são detectados por estarem em diferentes fases da infecção (WATERS et al., 2006; WHELAN et al., 2011). O teste intradérmico ainda apresenta limitações quanto à sensibilidade e especificidade (ALVAREZ et al., 2012), devido a reações cruzadas com espécies de micobactérias não patogênicas e *Mycobacterium avium* (LIU et al., 2007; WHELAN et al., 2008).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) preconiza que o teste intradérmico com PPD de *M. bovis* seja realizado na prega caudal, exclusivamente em gado de corte para triagem ou monitoramento de rotina ou pode ser executado na região cervical, sendo realizado como prova de rotina em gado de leite. O teste cervical comparativo (TCC) utiliza simultaneamente PPD de *M. bovis* e PPD de *M. avium*, pode ser utilizado como teste de rotina, além de ser prova confirmatória para animais reagentes ao teste da prega caudal (TPC) ou ao teste cervical simples (TCS). Os animais que apresentam uma diferença dos aumentos da dobra da pele, provocados pela inoculação de PPD de

M. bovis e ao PPD de *M. avium*, igual ou superior a 4 mm (PPD de *M. bovis* - PPD de *M. avium*), são considerados positivos para tuberculose (BRASIL, 2016).

Assume-se que a avaliação pareada das reações ao PPD de *M. bovis* e PPD de *M. avium* aumenta a especificidade do TCC e reduz abates de animais falso-positivos que apresentam reações cruzadas ao PPD de *M. bovis* pela sensibilização com micobactérias ambientais. No entanto, situações de coinfeção por *M. bovis* e micobactérias ambientais podem levar a reações intradérmicas de semelhante magnitude conduzindo a interpretações errôneas de diagnóstico (MOSAVARI et al., 2016).

Desta forma, neste estudo, objetivou-se investigar se o Teste Cervical Comparativo apresenta reações falso-negativas em animais verdadeiramente infectados com base no teste padrão-ouro para tuberculose bovina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho do Teste Cervical Comparativo (TCC) no diagnóstico da tuberculose bovina, em rebanhos submetidos a vazio sanitário.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar rebanhos naturalmente infectados com *Mycobacterium bovis*, mediante o TCC;
- Confirmar a infecção por *M. bovis* nos tecidos dos animais destes rebanhos, mediante cultivo, PCR e sequenciamento de DNA;

- Avaliar o desempenho do TCC, tomando-se como referência o cultivo de *M. bovis*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Etiologia

A tuberculose bovina tem como agente etiológico a espécie *Mycobacterium bovis*, que pertence à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* e faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que compreende também as espécies geneticamente relacionadas *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi* e *Mycobacterium orygis* (NIEMANN et al., 2000; ALEXANDER et al., 2010; VAN INGEN et al., 2012; PARSONS et al., 2013; OIE, 2015).

O genoma de *Mycobacterium bovis* é 99,95% semelhante geneticamente ao de *M. tuberculosis* (GARNIER et al., 2003; OIE, 2015). No entanto, essas micobactérias diferem muito em relação a hospedeiros, virulência e características fisiológicas (NIEMANN et al., 2000).

Mycobacterium bovis são cocobacilos que medem de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento. São microaerófilos, não flagelados, não esporulados, não capsulados e não formadores de toxina. Essas micobactérias são classificadas como bactérias Gram-positivas e bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), ou seja, são resistentes à descoloração com álcool-ácido quando corados pela fucsina a quente (coloração de Ziehl-Neelsen - ZN) (CORNER, 1994; COOK et al., 2009).

As micobactérias causadoras de tuberculose bovina são de crescimento lento, intracelulares e possuem um envelope celular complexo, formado principalmente por

uma variedade de lipídeos, que constitui 60% da massa total do bacilo. Este envelope celular consiste de glicolipídeos, lipomananos, lipoarabinomananos, lipoproteínas e ácidos micólicos, que são os primeiros a interagir com a célula hospedeira (COOK et al., 2009).

Os ácidos micólicos são um dos principais componentes da parede celular, encontram-se na porção externa, e junto com outros lipídeos (lipomanana e mana glicoproteínas) e a membrana celular, formam uma espessa camada hidrofóbica. Essa camada da micobactéria dificulta a entrada de nutrientes, fazendo com que seu crescimento seja lento, além de torná-la muito resistente a compostos hidrofílicos e a dessecação. Essa camada também aumenta a resistência à degradação celular, por meio de enzimas lisossomais (CORNER, 1994; COOK et al., 2009; KLEINNIJENHUIS et al. 2011).

3.2 Micobactérias ambientais

As micobactérias não tuberculosas são as espécies que não participam como membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e são tipicamente organismos ambientais que residem principalmente no solo e na água (BIET et al., 2005; BIET; BOSCHIROLI, 2014).

Algumas dessas micobactérias ambientais encontram-se agrupadas no complexo *Mycobacterium avium intracellulare* (MAC) que inclui as espécies *Mycobacterium intracellulare* e *Mycobacterium avium*, que é dividida em quatro subespécies, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* e *M. avium* subsp. *hominisuis* (BIET et al., 2005). Já o complexo *Mycobacterium terrae* compreende as espécies *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. hiberniae*, *M. triviale* e *M. arupense*. As espécies dos grupos *M. fortuitum*, *M.*

smegmatis e *M. chelonae-abscessus* são consideradas espécies de crescimento rápido (BIET; BOSCHIROLI, 2014).

Apesar dessas micobactérias não causarem tuberculose bovina, possuem importância por serem capazes de provocar reações inespecíficas no teste intradérmico (ARANAZ et al., 2006; MICHEL, 2008; AAGAARD et al., 2010), devido aos antígenos serem comuns com várias espécies de micobactérias (MONAGHAN et al., 1994; BIET; BOSCHIROLI, 2014).

Vários estudos de comparação genômica têm identificado e caracterizado certas regiões genéticas das micobactérias, indicando a presença de reação cruzada de proteínas homólogas de micobactérias não tuberculosas com as espécies de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, que são relacionadas filogeneticamente (VORDERMEIER et al., 2007; GCEBE et al., 2016).

As pesquisas de reatividade cruzada com as proteínas ESAT-6 e CFP10 encontraram homologia entre *M. tuberculosis* e *M. leprae* (GELUK et al., 2002; GELUK et al., 2004), e *M. bovis* e *M. kansasii* (VORDERMEIER et al., 2007). *Mycobacterium szulgai* e *M. flavescens* assemelham-se com *M. kansasii* e *M. gordonae* por compartilharem os genes que codificam para essas proteínas, o que pode conduzir para reações cruzadas nos testes diagnósticos de tuberculose bovina (VORDERMEIER et al., 2007).

Skjøt et al. (2002) identificaram TB10.3 e TB12.9 como proteínas homólogas de TB10.4, sendo encontradas em estirpes de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* incluindo BCG e *M. kansasii*, e em outras micobactérias como *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. marinum*.

Os resultados de um estudo detectaram que a proteína antigênica específica de *M. tuberculosis* PPE68, apresentou homologia na sequência genômica com várias proteínas de PPE de *M. tuberculosis*, com as espécies do complexo *M.*

tuberculosis e com outras espécies de micobactérias patogênicas, incluindo *M. leprae* e o complexo *M. avium intracellulare* (MUSTAFA, 2014).

Mais recente, uma pesquisa identificou epítomos imunogênicos de ESAT-6, CFP10, EsxH e PPE68 mediante análise genômica em algumas ou em todas as quatro espécies de micobactérias não tuberculosas e não patogênicas sequenciadas, sugerindo o potencial dessas proteínas em desencadear reações de respostas imunes cruzadas contra antígenos de bactérias do complexo de *M. tuberculosis*. A comparação de sequências de aminoácidos de *M. fortuitum*, *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* foram homólogas para ESAT-6 (GCEBE et al., 2016).

A importância da identificação de proteínas imunogênicas homólogas de micobactérias não tuberculosas com antígenos do complexo *M. tuberculosis* consiste na investigação mais aprofundada da capacidade desses antígenos de provocar respostas imunes de reação cruzada (BIET; BOSCHIROLI, 2014).

3.3 Importância econômica

A importância econômica da tuberculose bovina está relacionada, sobretudo, às perdas na produtividade animal, abate de bovinos reagentes, restrições comerciais e de segurança alimentar. No entanto, nos países em desenvolvimento, além das perdas econômicas, as taxas de prevalência da doença nos animais são mais elevadas e o risco de tuberculose zoonótica é maior (BENNETT; COOKE, 2006; MICHEL et al., 2010; SA'IDU et al., 2015).

A doença tem maior prevalência em rebanhos leiteiros estabulados, devido ao intenso contato entre os animais e à medida que a idade do rebanho aumenta. Já no gado de corte, criado no sistema extensivo e abatido precocemente, ocorre menor prevalência (ABRAHÃO et al., 2005).

No mundo, os prejuízos anuais com a tuberculose bovina foram estimados em torno de três bilhões de dólares (GARNIER et al., 2003). Atualmente, segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil é o maior exportador mundial de carne bovina, só no primeiro trimestre de 2016 exportou 287.267 mil toneladas de carne *in natura* para 76 destinos diferentes, dentre eles, os dez principais foram Hong Kong (20,6%), Egito (19,8%), China (12,5%), Rússia (12,2%), Irã (7,1%), Chile (6,0%), Itália (2,5%), Filipinas (1,7%), Israel (1,5%) e Emirados Árabes Unidos (1,5%), respondendo juntos por 85,5% da carne exportada. Neste mesmo período, o país abateu um total de 7.293 mil cabeças de bovinos (IBGE, 2016).

Nesse contexto de importância econômica, a presença de tuberculose bovina na pecuária tem gerado prejuízos relacionados principalmente com a redução da produção de leite e da conversão alimentar, perda de peso, abortamento, mortalidade de bezerros, maior intervalo entre partos e desvalorização comercial do animal infectado pela rejeição de sua carcaça (ABRAHÃO et al., 2005; BENNETT e COOKE, 2006). Além disso, a presença da doença nos rebanhos implica em barreira comercial à exportação de carne (BRASIL, 2012).

3.4 Cadeia epidemiológica

Os bovinos e bubalinos são os principais hospedeiros da tuberculose causada por *M. bovis*, entretanto, várias espécies domésticas, silvestres e, inclusive o homem são susceptíveis a este patógeno (MICHEL et al., 2010; ETCHECHOURY et al., 2010; OIE, 2015). *Mycobacterium bovis* pode infectar o rebanho principalmente pela aquisição de animais infectados ou pela propagação de bacilos por animais infectados advindos de propriedades vizinhas (GOODCHILD; CLIFTON-HADLEY, 2001).

Os animais infectados por *M. bovis* são a principal fonte de infecção, sendo possível a excreção de micobactérias antes mesmo do aparecimento de lesões anatomopatológicas (GOODCHILD; CLIFTON-HADLEY, 2001). A eliminação dos bacilos pode ser por ar expirado, fezes, urina, leite e outros fluidos corporais, dependendo dos órgãos acometidos pela doença (POLLOCK et al., 2006; CEZAR et al., 2016). A transmissão da doença por um bovino infectado depende da geração de aerossol, número de bacilos excretados e densidade do rebanho (POLLOCK et al., 2006).

A susceptibilidade dos bovinos para tuberculose está relacionada principalmente com a via de transmissão e a dose infecciosa, com influência de componentes genéticos e nutricionais, e pode ser aumentada pela infecção com vírus imunossupressores (GOODCHILD; CLIFTON-HADLEY, 2001; POLLOCK; NEILL, 2002; POLLOCK et al., 2006). Os zebuínos (*Bos taurus* subsp. *indicus*) são considerados mais resistentes à infecção por *M. bovis* do que as raças europeias (*Bos taurus* subsp. *taurus*) (VORDERMEIER et al., 2012). Entretanto, sob condições de alta densidade e maior contato a morbidade assemelha-se ao gado europeu (RADOSTISTS et al., 2002).

A transmissão de tuberculose bovina pode ocorrer por várias vias de infecção, dentre elas, a mais comum em bovinos é por inalação de *M. bovis*, sendo, portanto, a principal forma de eliminação dos bacilos a via aérea. A infecção pode se estabelecer no pulmão do bovino com apenas um bacilo transportado no interior de uma gotícula (MENZIES; NEILL, 2000; POLLOCK; NEILL, 2002). A transmissão por ingestão de *M. bovis* direto de animais infectados, pastos contaminados, fômites ou água é considerada secundária à infecção por inalação (MENZIES; NEILL, 2000).

As infecções congênita, genital ou intramamária podem ocorrer, mas são pouco frequentes devido à ação preventiva da maioria dos países com programas de erradicação (BIET et al., 2005; DOMINGO et al., 2014). Menzies et al. (2012) analisaram o risco de tuberculose bovina na progênie de vacas com infecção

confirmada, sendo estimado o risco relativo de 1,2 (0,8-1,7; 95% de intervalo de confiança) e concluíram que a progênie de vacas infectadas não aumentou o risco de infecção por *M. bovis*. Entretanto, bezerros nascidos com infecção congênita geralmente desenvolvem tuberculose generalizada nas primeiras semanas ou meses de vida (VURAL; TUNCA, 2001).

A via de transmissão e a dose infecciosa podem influenciar na infecção por *M. bovis* (PALMER et al., 2002; POLLOCK et al., 2006). Palmer et al. (2002) descreveram um método de infecção da doença em bovinos por meio de exposição de aerossóis de *M. bovis* (10^3 UFC). Os resultados sugeriram que o inóculo em aerossol se estabeleceu nos alvéolos pulmonares e, portanto, esse modelo de reprodução da doença representou a exposição verdadeira de infecção.

No homem, a infecção por *M. bovis* tem sido identificada em vários países por meio da caracterização dos isolados de micobactérias de pacientes humanos (ETCHECHOURY et al., 2010). A incidência de tuberculose pulmonar causada por *M. bovis* é maior nos trabalhadores agrícolas e de frigoríficos do que em habitantes urbanos (BENNETT; COOKE, 2006; SA'IDU et al., 2015).

A transmissão de tuberculose bovina para os humanos ocorre principalmente por consumo de leite e seus derivados não pasteurizados e por inalação de aerossol de animais e pessoas contaminadas (ETCHECHOURY et al., 2010; MICHEL et al., 2010; OIE, 2015). Por essa razão, em países de baixa renda as pessoas estão mais expostas ao risco de contrair a doença, devido à ausência de pasteurização de leite, fatores culturais como, por exemplo, o contato muito próximo com os animais e pessoas, mas também devido à pobreza, desnutrição e uma taxa superior de infecção de vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ETCHECHOURY et al., 2010; MICHEL et al., 2010).

3.5 Distribuição geográfica

A tuberculose bovina é uma zoonose de distribuição mundial com maior prevalência nos países em desenvolvimento e menor nos desenvolvidos, onde existem programas de controle e erradicação, inspeção de carnes e pasteurização do leite (MICHEL et al., 2010). No Brasil, a tuberculose bovina está disseminada por todo o território nacional. Várias pesquisas têm sido realizadas em diferentes regiões do país, buscando estimar a prevalência de tuberculose bovina.

Recentemente, Ferreira Neto et al. (2016) apresentaram os resultados de estudos sobre a prevalência de tuberculose bovina em 13 Estados do Brasil, que incluíram 75% da população de rebanho bovino brasileiro.

Na Tabela 1, são apresentados os resultados das prevalências de focos e de animais relatados nos estudos até agora realizados nas regiões dos Estados brasileiros. A situação da distribuição da doença no país é heterogênea entre os estados, com forte concentração nas regiões leiteiras. Em geral, os resultados demonstraram que a tuberculose bovina tem prevalência baixa na maioria das regiões do Brasil. Dentre os Estados estudados, São Paulo, Espírito Santo e Minas Gerais apresentaram maiores prevalências.

A variação na prevalência da tuberculose bovina nas diferentes regiões do Brasil pode estar relacionada a diversos fatores como fonte de aquisição de animais, manejo, rebanhos maiores e intensificação da produção leiteira. Entretanto, vários autores encontraram nos 13 Estados pesquisados os mesmos fatores de risco associados com a presença da tuberculose bovina, relacionados com aumento do tamanho do rebanho e a existência de ordenha mecanizada nas propriedades (BAHIENSE et al., 2016; BARBIERI et al., 2016; DIAS et al., 2016; GALVIS et al., 2016; GUEDES et al., 2016; LIMA et al., 2016; NÉSPOLI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016; ROCHA et al., 2016; SILVA et al., 2016; VELOSO et al., 2016; VENDRAME et al., 2016).

Tabela 1. Prevalência de focos e de animais positivos no Teste Cervical Comparativo para tuberculose bovina no Brasil.

Autor	Ano	Estado	Município/região	Estudos usando intradermoreação	
				Prevalência de focos (%)	Prevalência de animais (%)
Bahiense et al.	2016	BA	sul, leste, oeste e central	1,6	0,21
Barbieri et al.	2016	MG	Noroeste, Norte, Nordeste, Leste, Central, Zona da Mata, Sul, Sudoeste, Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro	4,25	0,56
Dias et al.	2016	SP	Norte, Nordeste, Leste, Central, Sul, Oeste, Sudoeste	9	1,3
Galvis et al.	2016	ES	Norte, Sul	7,6	0,7
Guedes et al.	2016	MS	Pantanal, Planalto Norte, Planalto Sul	1,3	0,035
Lima et al.	2016	PE	Zona da Mata, Agreste, Sertão	2,87	0,62
Néspoli et al.	2016	MT	Região Pantanal, Leite, Engorda e Cria	1,3	0,12
Queiroz et al.	2016	RS	Sul, Fronteira Oeste, Missões centrais, Norte, Serra, Áreas metropolitanas, Costa Norte	2,8	0,7
Ribeiro et al.	2016	DF	Distrito Federal	0,36	0,05
Rocha et al.	2016	GO	Norte e Nordeste, Sul e Sudeste, Sudoeste e Central	3,43	0,30
Silva et al.	2016	PR	Noroeste, Centro-Oeste-Norte, Fronteira Norte, Centro-Sul, Oeste, Leste-Sul, Sudeste	2,15	0,42
Veloso et al.	2016	SC	Serrana, Sul e Grande Florianópolis, Ocidente, Norte e Vale do Itajaí	0,50	0,06
Vendrame et al.	2016	RO	Norte, Leste e Oeste	2,3	0,12

3.6 Imunopatogenia

A resposta imune inicial contra as micobactérias é mediada por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T gama delta ($\gamma\delta$) e células *Natural Killer* (NK), sendo capazes de reduzir ou até mesmo eliminar a infecção. Entretanto, os bacilos desenvolvem mecanismos para escapar das respostas do hospedeiro, como inibição da maturação do fagossomo, interferência com a fusão do fagolissosomo, diminuição de autofagia, com subsequente diminuição na apresentação de antígenos, evasão do ambiente tóxico do fagossoma, e alterações de respostas a citocinas (POLLOCK et al., 2006; KLEINNIJENHUIS et al., 2011; PARLENE; BUDDLE, 2015).

Após duas a três semanas da infecção, os linfócitos T proliferam no local da lesão inicial e liberam citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama (IFN- γ), que ativam macrófagos para eliminar as micobactérias. Consequentemente, o crescimento de bacilos cessa e ocorre o desenvolvimento do granuloma com o objetivo de conter a infecção pelas micobactérias (KLEINNIJENHUIS et al., 2011)

Macrófagos e células dendríticas são células hospedeiras para as micobactérias, sendo capazes de fagocitar e eliminar os bacilos por meio de enzimas lisossomais, oxigênio reativo ou nitrogênio intermediário. Além disso, participam na iniciação da imunidade celular adquirida por apresentarem antígenos e expressarem sinais coestimulatórios e citocinas. Secretam interleucina-12 (IL-12), que é essencial para ativar células NK para liberação de IFN- γ , e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que tem importância na eliminação das micobactérias (LYADOVA; PANTELEEV, 2015; PARLENE; BUDDLE, 2015).

A ativação de macrófagos ocorre por meio da liberação de citocinas, como TNF- α , IL-12 e IFN- γ , que gera resposta imunológica do tipo Th1 e Th17. As células Th1 contribuem para proteção por secretarem IFN- γ , ativando a ação antimicrobiana em macrófagos. Já a principal citocina efetora de Th17, é IL-17, que induz inflamação, dano tecidual, e tem sido implicada na patologia de tuberculose bovina crônica (LYADOVA; PANTELEEV, 2015; LYADOVA; PANTELEEV, 2015). A resposta imune do tipo Th2 é estimulada por IL-4 ou IL-13, sendo uma resposta menos efetiva na eliminação de micobactérias (POLLOCK; NEILL, 2002).

As células T CD4 secretam predominantemente IFN- γ , sendo importante na inflamação e regulação da resposta imune, enquanto as células T CD8 estão envolvidas, principalmente, na lise das células infectadas (KLEINNIJENHUIS et al., 2011; PARLENE; BUDDLE, 2015).

Durante o estágio inicial de infecção por *M. bovis* a resposta predominante é a mediada por células Th1, que está relacionada com uma maior capacidade de conter a infecção, no entanto, com o progresso da doença, há uma mudança de dominância de resposta imune Th1 para Th2, que é associada com a supressão da resposta imune celular e aumento de resposta imune humoral (WELSH et al., 2005).

A resposta imune humoral na tuberculose bovina é caracterizada pelo reconhecimento de padrões variáveis de múltiplos antígenos de *M. bovis* (WATERS et al., 2006; WHELAN et al., 2008). Isso significa que, a cinética da resposta de anticorpos a antígenos apresenta uma mudança na imunodominância antigênica durante o curso da doença no mesmo hospedeiro (WATERS et al., 2006). Esta variação está associada à fase de reconhecimento de antígenos na resposta imune e pode ser uma consequência da produção diferencial de proteínas micobacterianas no curso da infecção (WATERS et al., 2006).

Em estágios avançados da doença, os bovinos podem desenvolver anergia ao teste intradérmico, que corresponde à ausência de resposta imune mediada por células, mesmo apresentando altos níveis de anticorpos circulantes (BOUSSIOTIS et al., 2000; POLLOCK e NEILL, 2002). Esta situação imunológica pode estar associada aos efeitos supressivos que os monócitos possam exercer sobre os linfócitos T, possivelmente mediados por fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e que células T antígeno-específicas podem induzir anergia por meio da produção de IL-10 na ausência de INF- γ (BOUSSIOTIS et al., 2000; POLLOCK e NEILL, 2002).

Várias pesquisas têm identificado candidatos a biomarcadores no diagnóstico de tuberculose bovina, incluindo interleucinas 1- β (IL-1 β), IL-2, TNF- α , óxido nítrico, IL-17 e proteína 10 induzida por IFN- γ (IP-10) (JONES et al., 2010; BLANCO et al., 2014; RHODES et al., 2014; GOOSEN et al., 2015; LYADOVA; PANTELEEV, 2015).

Recentemente, IL-17 e IL-22 foram comparadas com IFN- γ resultando em uma similar capacidade de diagnóstico (STEINBACH et al., 2016; WATERS et al., 2016). Steinbach et al. (2016) demonstraram que células T CD4 e $\gamma\delta$ são as principais produtoras de IL-22 e IL-17 em linfócitos de bovinos infectados com *M. bovis*. Outras citocinas associadas a Th17 como IL-2, IL-17F, IL-22 e IL-27 também foram indicadas como possíveis biomarcadores de infecção e de proteção na resposta imune de tuberculose bovina (BLANCO et al. 2014; STEINBACH et al., 2016; WATERS et al., 2016).

3.7 Métodos de diagnóstico direto

3.7.1. Diagnóstico anatomopatológico

O exame anatomopatológico para o diagnóstico da tuberculose bovina é realizado em frigoríficos, durante a inspeção sanitária das carcaças dos animais. A detecção macroscópica de lesões sugestivas de tuberculose ocorre pela presença do granuloma tuberculoso, sendo que o diagnóstico pode ser dificultado devido a outros patógenos, como *Actynomices bovis*, *Trueperella pyogenas*, entre outros, por compartilharem semelhantes características morfológicas do granuloma inflamatório (RAMOS et al., 2015).

O granuloma tuberculoso geralmente tem aparência amarelada, de consistência caseosa, caseo-calcária ou purulenta, e com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar calcificação no centro da lesão e geralmente, não odoríferas (DOMINGO et al., 2014; OIE, 2015). O método para o diagnóstico

macroscópico envolve inspeção visual, palpação e incisão dos linfonodos bronquiais, mediastinais e pré-escapulares, e dos pulmões, fígado, rins e do úbere (TEKLU et al., 2004; DOMINGO et al., 2014). As lesões sugestivas de tuberculose devem ser submetidas à confirmação bacteriológica ou histopatológica (CORNER, 1994). Caso seja detectada tuberculose generalizada, a carcaça inteira é condenada, caso contrário, somente o órgão ou linfonodo afetado é condenado (CORNER, 1994; TEKLU et al., 2004). Corner (1994) sugeriu que o exame macroscópico seja cuidadoso nos gânglios linfáticos, mesentéricos e pulmões, onde é possível identificar 95% dos animais com lesões.

Na necropsia, é mais comum encontrar lesões em linfonodos bronquiais, mediastinos e retrofaríngeos, além de pulmão, fígado, baço e em superfícies das cavidades do corpo (OIE, 2015). Alguns estudos têm detectado durante a inspeção de abate que a maioria das lesões tuberculosas (54-84%) é encontrada nos pulmões e linfonodos torácicos, seguido de linfonodos da cabeça (11,5-23%), mesentéricos e os demais da carcaça (4,5-23%) (ASSEGED et al., 2004; TEKLU et al., 2004). Recentemente, em búfalos africanos, foi identificada macroscopicamente a maioria das lesões em linfonodos retrofaríngeos (4/19), bronquiais (16/19) e mediastinos (11/19), e nos pulmões (4/19). Sendo que todas as lesões sugestivas de tuberculose bovina foram confirmadas por PCR (LAISSE et al., 2011).

A sensibilidade do exame macroscópico pode ser baixa quando comparada com outras técnicas de diagnóstico e pode ser afetada pela fase inicial da infecção, execução da técnica de necropsia ou por infecção causada por outra micobactéria que não seja *M. bovis* (CORNER, 1994). A sensibilidade de resultados de exames de laboratório (85,7%) foi superior aos da inspeção nas carcaças (28,7%), quando comparados com o isolamento de *M. bovis* (TEKLU et al., 2004). Entretanto, mesmo em tecidos sem lesões sugestivas de tuberculose, é possível identificar micobactérias no isolamento bacteriano (ASSEGED et al., 2004; TEKLU et al., 2004).

3.7.2 Diagnóstico bacteriológico

A cultura bacteriológica é considerada o método padrão ouro para confirmação de infecção por *Mycobacterium bovis* (OIE, 2015), no entanto, o diagnóstico bacteriológico pode demorar mais de 12 semanas para confirmação da infecção (CORNER, 1994). O isolamento de *M. bovis* requer meio de cultura seletivo e subsequente confirmação pela identificação por características das colônias, testes bioquímicos ou PCR (OIE, 2015).

As colônias crescem lentamente e precisam de um longo período de incubação, no mínimo oito semanas (preferencialmente 10-12 semanas), a 37°C com ou sem CO₂. *Mycobacterium bovis* é negativo à prova da niacina e sensível para isoniazida, hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico, ácido para-aminosalicílico e neotetrazolio (CORNER, 1994; CORNER et al., 2012).

Alguns fatores podem influenciar a sensibilidade do diagnóstico bacteriológico da tuberculose bovina, que incluem a estocagem e transporte das amostras, escolha do meio de cultura, procedimento de descontaminação, e o tempo de incubação (CORNER, 1994; CORNER et al., 2012; GORMLEY et al., 2014).

As amostras para o isolamento de *M. bovis* incluem tecidos com lesões sugestivas de tuberculose, que se encontram principalmente em linfonodo submandibular, retrofaríngeo, traqueobronqueal, mediastinal, mesentéricos e órgãos parenquimatosos, como pulmões, fígado e baço (GORMLEY et al., 2014).

Os tecidos coletados são homogeneizados e submetidos à descontaminação, que consiste na inativação de microrganismos que possam estar presentes na amostra, entretanto, o efeito tóxico pode afetar a viabilidade das micobactérias (CORNER, 1994; GORMLEY et al., 2014).

O método de descontaminação da amostra pode envolver a adição de substância detergente (Cloreto de hexadecilpiridínio - HPC 0,375-0,75%), alcalina (hidróxido de sódio - NaOH 2-4%) ou ácida (ácido oxálico 5%) (CORNER, 1994; OIE, 2015). O método de descontaminação HPC 0,75% apresentou menor toxicidade para *M. bovis*, resultando em mais isolamentos (40%) quando comparado com NaOH 4% (13%), e ácido sulfúrico 6% (H_2SO_4) (1,7%) (AMBROSIO et al., 2008; MEDEIROS et al., 2012). Porém, quando ambos os métodos de descontaminação, HPC 0,75% e H_2SO_4 6% foram usados, foi possível identificar 92,9% dos animais infectados (MEDEIROS et al., 2012).

Os meios de cultivo para o isolamento de *M. bovis* devem ser enriquecidos pela adição de piruvato de sódio, pois esse utiliza o piruvato como fonte de carbono para o seu desenvolvimento e na presença de glicerol o crescimento é inibido. Os meios para cultivo de micobactérias incluem os meios sólidos à base de ovos, como Stonebrink-Leslei e Löwenstein–Jensen com adição de piruvato, meios à base de ágar enriquecido com soro e/ou sangue, Middlebrook 7H10, 7H11 e B83, e meio líquido, como Middlebrook 7H9 (GORMLEY et al., 2014).

Corner et al. (2012) analisaram o impacto do tipo de meio no aparecimento das colônias de *M. bovis*. Na comparação dos meios de cultivo houve crescimento com 28 dias nos meios à base de ágar (7H11 e B83) e com 36 dias no meio à base de ovos (Stonebrink-Leslei). Entretanto, no meio Stonebrink-Leslei ocorreu mais crescimento de colônias e mais amostras foram positivas, indicando ser um meio mais sensível que o meio à base de ágar.

3.7.3 Diagnóstico histopatológico

O exame microscópico para identificar *M. bovis* pode ser analisado em esfregaços diretos de amostras clínicas por coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) ou a

partir de amostras de tecidos coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE) para identificar lesões de *M. bovis* (HE) (CORNER, 1994; OIE, 2015).

As lesões histológicas do granuloma geralmente são paucibacilares e se caracterizam por uma área de necrose central com ou sem mineralização, cercada por macrófagos, linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, células epitelióides, células gigantes de Langhans e, às vezes é coberta por uma cápsula fina (VARELLO et al., 2008).

O exame histopatológico apresenta a vantagem de se obter resultado em até dois dias, sendo possível confirmar lesões sugestivas de tuberculose antes do resultado bacteriológico (CORNER, 1994), além de demonstrar alta acurácia pelo método de HE quando comparado com o método de ZN, com sensibilidade de 93,4% e especificidade de 92,3%. Enquanto que, por meio da técnica de ZN a sensibilidade é de 33,9% e a especificidade de 100% (VARELLO et al., 2008).

Outras técnicas, como coloração com auramina-rodamina ou imunohistoquímica têm sido sugeridas para substituir a técnica de ZN, por serem métodos mais sensíveis e que poderiam detectar mais animais positivos (WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006).

3.7.4 Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR), que inclui PCR em tempo real (qPCR), nested-PCR, nested-PCR em tempo real (nested q-PCR), PCR multiplex, *touch-down*-PCR têm mostrado ser eficazes e de fácil aplicação no diagnóstico de tuberculose bovina (EREQAT et al., 2010; REDDINGTON et al., 2011; ARAÚJO et al., 2014; CEZAR et al., 2016). A detecção de *M. bovis* por essas técnicas pode ser a partir de amostras de sangue, leite ou exsudato nasal (ZUMÁRRAGA et al., 2005; CEZAR et al., 2016). Essas técnicas são

rápidas, sensíveis e específicas e podem ser um diagnóstico alternativo para o método de cultura na detecção de *M. bovis* em amostras de animais (ZUMÁRRAGA et al., 2005).

Estudos têm utilizado técnicas de PCR em tempo real para identificar e diferenciar *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Recentemente, um estudo detectou *M. bovis* em amostras de leite e de sangue de vacas leiteiras e o diagnóstico foi confirmado pelo sequenciamento genômico (CEZAR et al., 2016). Outro ensaio, com base em um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) nos genes *narGHJI* e *oxyR* diferenciou entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* e identificou *M. bovis* com base na região de diferenciação 1 (RD1) (EREQAT et al., 2010).

Uma técnica de PCR *multiplex* em tempo real foi desenvolvida para identificar e simultaneamente diferenciar *M. bovis*, *M. bovis* BCG e *M. caprae*, e pode ser usada em conjunto com outra PCR *multiplex* em tempo real descrita pelo mesmo grupo de estudo. Esses ensaios, utilizados em conjunto foram capazes de identificar e diferenciar cinco membros do complexo *M. tuberculosis* (*M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. tuberculosis* e *M. canettii*) (REDDINGTON et al., 2011). Uma pesquisa mais recente, desenvolveu uma PCR *multiplex* capaz de diferenciar também *M. bovis*, *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*, a partir dos iniciadores 16S rRNA, Rv3873 e o fragmento do genoma 12,7-kb (QUAN et al., 2016).

Um estudo avaliou um teste de nested q-PCR capaz de detectar o complexo *M. tuberculosis* diretamente de lesões sugestivas de tuberculose. Demonstrou maior eficiência na detecção 28% (56/198) quando comparado com o teste de PCR *multiplex* 7% (14/198) e diagnóstico microbiológico 1,5% (3/198) (CARVALHO et al., 2015). Araújo et al. (2014) desenvolveram uma nested-PCR para TbD1, com o objetivo de detectar *M. bovis* diretamente de amostras de tecidos. A sensibilidade e especificidade foram de 76% e 100%, respectivamente. O teste apresentou resultados semelhantes ao cultivo na detecção de animais positivos no teste intradérmico e com lesões sugestivas de tuberculose ou de animais positivos no

teste intradérmico, porém sem lesões visíveis. O teste foi mais sensível que a cultura ao detectar *M. bovis* em animais sem histórico de teste intradérmico, mas que apresentaram lesões sugestivas durante as inspeções sanitárias nos abatedouros.

Choi et al. (2014) desenvolveram um ensaio de PCR que combinou as vantagens das técnicas de nested-PCR e qPCR, visando a amplificação da sequência de *IS6110* de *M. tuberculosis* em um único procedimento. A técnica apresentou sensibilidade superior (100%-167/167) a qPCR convencional (94,6%-158/167) e ao kit comercial de qPCR, *AdvanSure TB/NTM* (91%-152/167), além de ser de manipulação simples.

Comparações foram realizadas entre um ensaio de PCR *in house* e o *Kit Cobas Amplicor M. tuberculosis*TM, sendo que os resultados indicaram maior sensibilidade na PCR *in house* (81,3%) e maior especificidade no kit comercial (100%) (KIM et al., 2008). Outra técnica foi desenvolvida com base em um protocolo de *touch-down-PCR*, que quando comparado com a PCR convencional aumentou o nível de detecção de *M. bovis* em amostras bovinas de leite e *swab* nasal (ZUMÁRRAGA et al., 2005)

Outras técnicas moleculares, como *spoligotyping*, MIRU-VNTR, *IS6110-RFLP* e *PGRS* têm sido utilizadas na epidemiologia molecular. Essas técnicas são capazes de diferenciar cepas dentro de cada espécie do complexo *M. tuberculosis*, sendo possível determinar padrões de origem, transmissão e disseminação de tuberculose bovina. A associação dessas técnicas moleculares pode aumentar a capacidade de identificação e diferenciação entre as cepas (OIE, 2015).

Entretanto, os ensaios de PCR ainda possuem limitações no diagnóstico da tuberculose bovina relacionadas a contaminações laboratoriais que podem conduzir a resultados falso-positivos, presença de substâncias nas amostras que possam inibir a atividade da *Taq* DNA polimerase, e a falta de padronização dos protocolos

de PCR *in house* que levam à fraca reprodutibilidade dos resultados (ZUMÁRRAGA et al., 2005).

3.8 Métodos de diagnóstico indireto

3.8.1 Teste intradérmico

O método padrão para detecção de tuberculose bovina é o teste intradérmico, que consiste na injeção intradérmica de antígenos micobacterianos, denominado de derivado proteico purificado (PPD), e subsequente detecção da resposta celular por meio de reações de hipersensibilidade tardia causada pela infecção por micobactérias (OIE, 2015).

O PPD consiste de uma mistura de proteínas, lipídeos, açúcares, ácidos nucléicos e vários antígenos obtidos de cultivos de *Mycobacterium* sp., muitos destes são comuns às espécies de micobactérias, o que implica em reações inespecíficas (MONAGHAN et al., 1994). A cepa comumente utilizada para a produção de PPD bovino é a AN5 de *M. bovis*, e o PPD aviário é sintetizado a partir da D4 de *M. avium* (MONAGHAN et al., 1994).

O Código Zoossanitário Internacional da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda que a dose de PPD bovino tenha no mínimo 2000 UI e que a potência estimada não deve ser menos de 66% e não mais que 150% da potência declarada pelo fabricante no rótulo (OIE, 2015). No Brasil, o PPD bovino contém 1 mg de proteína por mL (32.500 UI) e o PPD aviário contém 0,5 mg de proteína por mL (25.000 UI) (BRASIL, 2006).

A reação de hipersensibilidade tardia é mediada pela interação entre células T CD4 previamente sensibilizadas e os antígenos apresentados por macrófagos em associação com as moléculas do MHC de classe II (MONAGHAN et al., 1994; WHELAN et al., 2011). A resposta à inoculação de PPD é avaliada pelo aumento da espessura da dobra da pele após 72h da inoculação (MONAGHAN et al., 1994; BRASIL, 2006).

No Brasil, de acordo com o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), os testes de rotina para o diagnóstico de tuberculose são o teste cervical simples (TCS), o teste da prega caudal (TPC) e o teste cervical comparativo (TCC), sendo que o último também é utilizado como teste confirmatório. O teste intradérmico pode ser classificado em simples (TCS ou TPC), realizado somente com PPD bovino, ou comparativo (TCC), que utiliza PPD bovino e PPD aviário, e deve ser efetuado em bovinos e bubalinos, com idade igual ou superior a seis semanas, realizados por médico veterinário habilitado ou médico veterinário oficial (BRASIL, 2016).

O teste da prega caudal pode ser utilizado como teste de rotina, porém, exclusivamente na pecuária corte. O PPD bovino é injetado na base da cauda do animal na junção da pele pilosa e da pele glabra, na dosagem de 0,1mL. Após 72h da inoculação é realizada a interpretação do teste, que classifica o animal como reagente, caso ocorra qualquer aumento de espessura da prega inoculada. Os animais reagentes poderão ser submetidos a teste cervical comparativo, num intervalo de sessenta a noventa dias, ou, a critério do médico veterinário responsável pela realização do exame e do proprietário, serem destinados ao abate sanitário ou à eutanásia (BRASIL, 2016).

O teste cervical simples é a prova de rotina em gado de leite devido à sua boa sensibilidade. A inoculação de PPD bovino, na dosagem de 0,1 mL, deve ser realizada na região cervical ou na região escapular. O local da inoculação é demarcado por tricotomia e a espessura da dobra da pele é medida com cutímetro antes da inoculação e após 72 horas. O aumento da espessura da dobra da pele (DB) é calculado subtraindo-se da medida da dobra da pele após 72 horas da inoculação, a medida da dobra da pele no dia da inoculação do PPD bovino, e os resultados em bovinos são interpretados de acordo com os critérios do PNCEBT: se $DB \leq 1,9$ mm o resultado do teste é negativo; se DB for de 2,0 a 3,9 mm e o local da

inoculação apresentar pouca dor, endurecido e reação delimitada o resultado pode ser considerado inconclusivo, mas se houver muita dor, consistência macia, presença de exsudato ou necrose o resultado é positivo como também se $DB \geq 4,0$ mm. Os animais com resultados inconclusivos e positivos poderão ser submetidos ao teste cervical comparativo, em um intervalo de sessenta a noventa dias ou, a critério do médico veterinário responsável pela realização do exame e do proprietário, destinados ao abate sanitário ou à eutanásia (BRASIL, 2016).

O teste cervical comparativo pode ser realizado como teste de rotina ou como prova confirmatória para animais reagentes ao TPC ou ao TCS, todavia, também pode ser empregado como única prova diagnóstica em rebanhos com histórico de reações inespecíficas, estabelecimentos certificados como livres e para estabelecimentos de criação de bubalinos. As inoculações de PPD bovino e PPD aviário são realizadas via intradérmica na dosagem de 0,1 mL, na região cervical ou na região escapular, a uma distância entre as duas inoculações de 15 a 20 cm, sendo o PPD aviário inoculado cranialmente e o PPD bovino caudalmente. Os locais das inoculações são demarcados por tricotomia e a espessura da dobra da pele é medida com cutímetro, antes e após 72 horas da inoculação. Os resultados do teste são obtidos subtraindo-se da medida da dobra da pele obtida 72 horas após a inoculação, a medida da dobra da pele tomada no dia da inoculação, tanto para a tuberculina aviária (DA) quanto para a tuberculina bovina (DB). Em seguida subtrai-se DA de DB. Os resultados obtidos são interpretados de acordo com os critérios definidos no Regulamento Técnico do PNCEBT: se $\leq 1,9$ mm, o resultado do teste é negativo; se 2,0 a 3,9 mm o resultado do teste é inconclusivo; se $\geq 4,0$ mm, o resultado do teste é positivo. Os animais inconclusivos ao teste cervical comparativo poderão ser submetidos a um segundo TCC, num intervalo de sessenta a noventa dias, ou, a critério do médico veterinário responsável pela realização do exame e do proprietário, serem considerados positivos e destinados ao abate sanitário ou à eutanásia, e os animais que apresentarem dois resultados inconclusivos consecutivos serão classificados como positivos (BRASIL, 2016).

Embora seja o método recomendado para o diagnóstico de animais infectados com *M. bovis* (OIE, 2015), o teste intradérmico tem apresentado problemas quanto à sensibilidade e a especificidade (ÁLVAREZ et al., 2012; FARNHAM et al., 2012; KAROLEMEAS et al., 2012; GOODCHILD et al., 2015). Essas limitações podem estar relacionadas a fatores inerentes ao método, principalmente pela utilização de PPD bovino no TCS, e/ou por fatores relacionados ao hospedeiro (MONAGHAN et al., 1994; AAGAARD et al., 2010; ÁLVAREZ et al., 2012).

Diante disso, o teste pode indicar resultados falso-positivos no diagnóstico, devido a reações cruzadas com espécies de micobactérias não tuberculosas, como *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium avium* (ARANAZ et al., 2006; MICHEL, 2008; AAGAARD et al., 2010; MOSAVARI et al., 2016). Além de que, a execução do método torna-se difícil em inquéritos epidemiológicos de larga escala e em análises epidemiológicas retrospectivas, principalmente devido à necessidade de conter o animal mais de uma vez (LIU et al., 2007).

Recentemente, Mosavari et al. (2016) sugeriram uma revisão técnica na atual política de diagnóstico de tuberculose bovina, diante dos casos de coinfeção por micobactérias e casos de tuberculose bovina persistente em fazendas livres da doença.

Um estudo de metanálise nos Estados Unidos estimou sensibilidade que variou entre 74,4% e 88,4% e especificidade entre 97,3% e 98,6% nos testes intradérmicos para tuberculose bovina realizados em rebanhos bovinos (FARNHAM et al., 2012).

Na Grã-Bretanha, a sensibilidade do teste intradérmico foi de 85% comparada com o exame macroscópico em bovinos abatidos positivos e negativos ao teste intradérmico comparativo (KAROLEMEAS et al., 2012). No entanto, outro estudo

recentemente conduzido também na Grã-Bretanha, encontrou especificidade de 99,87% (GOODCHILD et al., 2015).

Na Espanha, a avaliação da sensibilidade foi estimada em média de 66-69% e especificidade >99% nos rebanhos de bovinos infectados naturalmente (ÁLVAREZ et al., 2012).

Recentemente, vários estudos têm buscado novos antígenos específicos do complexo *M. tuberculosis* para melhorar o diagnóstico da tuberculose bovina. Dentre os antígenos que se destacam pela capacidade de estimulação de células T, estão ESAT-6, CFP-10, MPB70, MPB83, Rv3615c, Rv3020c TB10.4, Rv3872 e MPT63 (WATERS et al., 2004; WHELAN et al., 2010; CASAL et al., 2012; JONES et al., 2012; FLORES-VILLALVA et al., 2012; XIN et al., 2013).

As combinações de antígenos em técnicas diagnósticas para tuberculose bovina têm possibilitado a diferenciação de animais infectados de animais vacinados (do inglês, *DIVA test - distinguishes infected from vaccinated animals*), e também, pode aumentar a padronização e controle de qualidade dos antígenos comparado com o PPD bovino (CASAL et al., 2012).

O coquetel de antígenos específicos do complexo *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, MPB70, MPB83) mostrou potencial (sensibilidade de 73,6% e especificidade de 100%) para ser utilizado em teste *DIVA*, pois não induziu resposta em bovinos vacinados com BCG (WHELAN et al., 2010). Uma combinação de ESAT-6 e CFP-10, também teve capacidade de identificar uma proporção de animais que o PPD bovino não reconheceu, especialmente em rebanhos de baixa prevalência. Além disso, o coquetel não induziu reação em bovinos livres de *M. bovis* e nem em bovinos infectados com paratuberculose (FLORES-VILLALVA et al., 2012).

Já o coquetel de peptídeos com ESAT-6, CFP-10 e Rv3615c, embora tenha permitido a diferenciação entre bovinos infectados com *M. bovis* de bovinos

vacinados, apresentou sensibilidade menor (47,8% - 75%) que a obtida com PPD bovino (60,9% - 87,5%) (CASAL et al., 2012; JONES et al., 2012). Entretanto, a adição do antígeno Rv3020c melhorou a sensibilidade diagnóstica (87,5%) sem comprometer a especificidade (JONES et al., 2012).

A adição de outros antígenos individuais como MPB70, MPB83, Rv3615c e Rv3020c em combinação com coquetéis de antígenos tem mostrado capacidade de aumentar a sensibilidade do teste em bovinos infectados naturalmente sem comprometer a especificidade (WHELAN et al., 2010; JONES et al., 2012). No entanto, a adição de MBP83 no coquetel de ESAT-6 e CFP-10 não fez diferença (FLORES-VILLALVA et al., 2012).

Os resultados das combinações de coquetéis de proteínas CFP-10/ESAT-6/TB10.4 e CFP-10/ESAT-6/Rv3872/MPT63 que foram testadas no teste intradérmico, mostraram que o coquetel de proteínas com CFP-10/ESAT-6/TB10.4 diferenciou bovinos infectados com *M. bovis* daqueles infectados com *M. avium* melhor do que o coquetel de proteínas com CFP-10/ESAT-6/Rv3872/MPT63, com boa correlação entre teste intradérmico com PPD bovino. Comparado com o teste intradérmico, a sensibilidade foi de 87% e a especificidade de 97% (XIN et al., 2013).

3.8.2 Teste de interferon-gama (IFN- γ)

O teste de interferon-gama (IFN- γ) é um ensaio *in vitro* que mensura resposta imune mediada por célula. A infecção por tuberculose bovina é identificada pela produção de IFN- γ após estimulação com antígenos de *M. bovis* (WOOD; ROTHEL, 1994; WOOD; JONES, 2001).

As amostras de sangue de animais suspeitos são incubadas durante 16-24 horas a 37°C, mediante estimulação com PPD bovino, PPD aviário e antígenos de controle negativo, para liberação de IFN- γ , seguido da mensuração da produção da

citocina no plasma por imunoensaio enzimático que utiliza anticorpo monoclonal anti-IFN- γ (WOOD; ROTHEL, 1994). A ausência de detecção de IFN- γ caracteriza a negatividade do animal para infecção por *M. bovis*, visto que linfócitos T de animais não infectados não produzem especificamente essa citocina (WOOD; JONES, 2001).

A utilização do teste de IFN- γ para o diagnóstico de tuberculose bovina é aprovada por restritos programas nacionais, como o da União Europeia, Estados Unidos, Nova Zelândia e Austrália (OIE, 2015). Na Nova Zelândia é utilizado na modalidade de teste seriado para aumentar especificidade e como diagnóstico paralelo ao teste intradérmico para aumentar sensibilidade do diagnóstico (SINCLAIR et al., 2016).

Estudos têm sugerido que a aplicação do teste de IFN- γ em paralelo ao teste intradérmico melhora a sensibilidade do diagnóstico, aumentando a detecção de infecção por *M. bovis* (ÁLVAREZ et al., 2012; SINCLAIR et al., 2016). Dado que, o teste de IFN- γ pode diagnosticar mais precocemente do que o teste intradérmico, com apenas 14 dias pós-infecção, essa associação dos testes pode facilitar a remoção precoce de animais infectados no rebanho que não foram identificados no teste intradérmico (GORMLEY et al., 2006).

Por ser um método de diagnóstico *in vitro*, o ensaio de IFN- γ não interfere no estado imunológico do animal, sendo possível repetir o teste quando for necessário sem intervalo de tempo. Apresenta grande acurácia na leitura dos resultados por ser automatizado, e para realização do teste o animal precisa ser capturado apenas uma vez (WOOD; JONES, 2001).

Entretanto, a utilização do teste de IFN- γ ainda não é amplamente difundida, principalmente devido ao alto custo dos *kits* comerciais, dificuldades logísticas associadas com demanda de tempo restrito para execução do teste, armazenamento das amostras de sangue em temperatura 10-26°C, alto custo com

laboratório e, além disso, ocorrência de reações cruzadas com micobactérias ambientais (GORMLEY et al., 2004).

A utilização de antígenos específicos de *M. bovis* no ensaio de IFN- γ tem melhorado a especificidade no diagnóstico da tuberculose bovina, sendo possível minimizar resultados falso-positivos (EIRIN et al., 2015). As proteínas ESAT-6 e CFP-10 foram capazes de diferenciar bovinos infectados com *M. bovis* daqueles vacinados com BCG, apresentando sensibilidade de 77,9% e especificidade de 100% (VORDERMEIER et al., 2001; AAGAARD et al., 2006). Outro estudo indicou que esses antígenos podem ser empregados na detecção de tuberculose bovina mesmo em condições de alta exposição a *M. avium* ou *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (WATERS et al., 2004).

Eirin et al. (2015), ao avaliarem seis proteínas específicas de *M. bovis*, Mb1992, Mb2031c, Mb2319, Mb2843c, Mb2845c e Mb3212c, com o objetivo de encontrar novos antígenos e potenciais candidatos para serem usados no ensaio de IFN- γ , observaram que o antígeno Mb2845c se mostrou mais potente em discriminar bovinos positivos e negativos no teste intradérmico ou animais infectados com *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

3.8.3 Testes sorológicos

Os testes sorológicos disponíveis têm mostrado benefícios na detecção de tuberculose bovina, quando se utilizam vários antígenos (WATERS et al., 2006; GREENWALD et al., 2009; WHELAN et al., 2011). Assim, um teste que detecte ambos os anticorpos específicos IgM e IgG e o uso de quimeras contendo as principais proteínas de *M. bovis* hipoteticamente seriam capazes de detectar anticorpos em diferentes fases da infecção (WATERS et al., 2006; SOUZA et al., 2012). Entretanto, imunoenaios que utilizam um único antígeno específico

diminuem o risco de reações cruzadas com outras micobactérias e o custo do teste (JOLLEY et al., 2007; GREEN et al., 2009; NGANDOLO et al., 2009).

Dentre os vários ensaios desenvolvidos para detectar anticorpos está o ensaio de *Multi-Antigen Print ImmunoAssay (MAPIA)* (Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY, USA) que é baseado em 12 antígenos recombinantes (ESAT-6, 14kDa, MPT63, 19kDa, MPT70, MPT64, MPT51, MTC28, Ag 85B, 38kDa, MPT32, KatG) que são aplicados em membranas de nitrocelulose por micro-dispersão em aerossol (de impressão), seguido por detecção de anticorpos por meio de teste imunocromatográfico. O *MAPIA* caracteriza resposta sorológica em bovinos e outras espécies de hospedeiros infectados com *M. bovis* e se apresentou superior ao ELISA convencional baseado nos mesmos antígenos, com sensibilidade de diagnóstico de 56-72% e 49-56%, respectivamente (LYASHCHENKO et al., 2000; WATERS et al., 2006).

Outro imunoensaio, o *multiplex Enferplex TB* (Enfer Scientific, Naas, Ireland), também detecta e analisa simultaneamente, respostas de anticorpos para 25 antígenos (α Crystalin_2, HspX, CFP-10, RPFc, Rv2878, ESAT-6, PPE68, Rv3616c, Rv3879c, MPB70, MPB83, Rv0283, Rv2626, Rv1926c, EsxH, PE35, Rv1573c, Rv1585c, Rv1580c, Rv1572c). Pesquisas em bovinos observaram sensibilidade entre 77-93,1% e especificidade de 77,6-98,4% e demonstraram que o imunoensaio não reage com os soros de bezerros vacinados com BCG, sendo adequado para diferenciar animais infectados de vacinados (WHELAN et al., 2008; WHELAN et al., 2010).

O imunoensaio *Enferplex TB* detectou 88,3% dos 60 bovinos infectados com *M. bovis*, confirmados por histopatologia e/ou cultura bacteriológica, sendo que destes animais, 43,3% foram negativos e 56,7% inconclusivos no teste intradérmico. Estes resultados sugerem que a detecção de animais infectados com *M. bovis* pode melhorar quando se associa o teste intradérmico e o ELISA *multiplex* (WHELAN et al., 2011).

De outra maneira, os ensaios *Fluorescence Polarization Assay (FPA)* (Diachemix, Grayslake, IL, USA) e o *Seralyte-Mbv - single antigen chemiluminescence* (Pritest, Redmond, Wa) identificam respostas de anticorpos contra um único antígeno. O *FPA* utiliza como antígeno um polipeptídeo derivado da proteína MPB70 de *M. bovis*, F-733 e demonstrou ser altamente específico (99,5-100%), porém apresentou sensibilidade que variou entre 6,5 a 50% e quando comparado ao teste intradérmico obteve menor desempenho nos resultados (JOLLEY et al., 2007; NGANDOLO et al., 2009). Já o *Seralyte-Mbv*, detecta respostas ao antígeno de *M. bovis* MPB83 utilizando uma plataforma de ensaio de quimioluminescência com um elevado grau de sensibilidade analítica. Apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 98% nos resultados que utilizaram soro de bovinos infectados experimentalmente e soro controle (GREEN et al., 2009).

O teste *Vet TB Stat Pak* (Chembio) utiliza tecnologia de fluxo lateral que detecta anticorpos utilizando um coquetel de proteínas (ESAT-6, CFP-10, MPB83) de *M. tuberculosis* e de *M. bovis* e um sistema de detecção de sinal baseado em micropartículas de látex azul (LYASHCHENKO et al., 2006). Em animais infectados experimentalmente, este teste detectou precocemente respostas de anticorpos de 60% dos animais após 7 semanas de infecção, e 96% dos animais após 18 semanas de infecção (WATERS et al., 2006).

O *Dual Path Platform (DPP)* (Chembio Diagnostic Systems) é um teste de imunocromatografia, que tem duas bandas de antígenos (MPB83) e (CFP-10 / ESAT-6 fusionadas), para detecção de anticorpos. Em comparação com *MAPIA* e *Vet TB Stat Pak* demonstrou sensibilidade de 100% e especificidade de 95,2% (GREENWALD et al., 2009). Já em comparação com um ELISA-bPPD (ELISA que utiliza derivado de proteína purificada bovina) com sensibilidade de 51% e especificidade de 96%, o *DPP VetTB* apresentou sensibilidade entre 62-71% e especificidade entre 88-95%, sendo que a sensibilidade aumentou para 97% quando associado com o teste intradérmico (BOADELLA et al., 2012). O ensaio *DPP VetTB*

apresentou alta sororeatividade às proteínas ESAT-6 e CFP-10 em animais infectados naturalmente com *M. bovis*, e a proteína MPB83 detectou mais animais infectados experimentalmente. A sensibilidade foi de 65,1% e especificidade de 97,8% (LYASHCHENKO et al., 2013).

O teste *IDEXX M. bovis Ab* ELISA detecta anticorpos para os antígenos de *M. bovis* MPB83 e MPB70 em amostras de soro e leite. Um estudo com esse teste identificou anticorpos em amostras de leite, em animais infectados experimentalmente entre 90 e 100 dias após infecção e em animais infectados que não foram detectados no teste intradérmico. A sensibilidade foi de 63% e especificidade de 98% em bovinos naturalmente infectados (WATERS et al., 2011; BUDDLE et al., 2013). Em outro estudo, resultados revelaram a sensibilidade de 50% e especificidade de 99%, considerando a cultura como teste padrão (HIRPA et al., 2014).

Um estudo de avaliação dos testes *IDEXX M. bovis Ab* e *Enferplex TB* demonstrou que o maior nível de detecção de animais infectados para sorologia foi alcançado utilizando o teste *IDEXX M. bovis Ab* aos 15 dias pós-testes intradérmicos, com sensibilidade de 70,4% e especificidade de 85,2% (CASAL et al., 2014).

Os testes *FPA*, *MAPIA*, *Vet TB Stat Pak* e *DPP VetTB* foram comparados com o teste intradérmico para a detecção de infecção por *M. bovis*. Os resultados apresentaram concordância entre os testes sorológicos, porém não foram compatíveis com os resultados do teste intradérmico, que foi atribuído às diferentes respostas imunológicas dos testes (CHAPINAL et al., 2012).

Estes testes sorológicos têm apresentado problemas com sensibilidade e especificidade, relacionados com a escolha de antígenos e o formato dos imunoenaios, ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de micobactérias, fase de infecção da doença e os isótipos dos anticorpos envolvidos

na resposta imune (AMADORI et al., 2002; WHELAN et al., 2008; BUDDLE et al., 2013). Para o desenvolvimento de testes mais sensíveis para o diagnóstico sorológico da tuberculose bovina é necessária à compreensão detalhada dos mecanismos imunes humorais induzidas por infecção com *M. bovis* e a identificação dos principais antígenos envolvidos nas respostas de anticorpos durante a tuberculose bovina. Também é necessário entender as respostas imunes cruzadas a micobactérias ambientais, já que muitos antígenos são comuns entre estas e o *M. bovis* (WATERS et al., 2006). Com isso, vários antígenos e imunoenaios têm sido testados para detectar tuberculose bovina.

3.9 Pesquisas por novos antígenos

Nos últimos anos várias pesquisas têm buscado novos antígenos para serem utilizados nos imunoenaios, devido à sensibilidade e especificidade variáveis nos testes sorológicos (WATERS et al., 2006; WHELAN et al., 2008; GREEN et al., 2009).

Os antígenos ESAT-6, CFP-10, MPB70 e MPB83 têm sido descritos como potenciais alvos de diagnóstico no ELISA, no entanto, a proteína de *M. bovis* MPB83 é considerada antígeno soro dominante (WATERS et al., 2006; LYASHCHENKO et al., 2008). MPB70 e P27 foram testadas no ELISA indireto e apresentaram sensibilidade de 88,7% e 94,6% e especificidade de 88,7% e 94,6%, respectivamente (FARIAS et al., 2012).

As respostas contra MPB83 em infecções experimentais foram detectadas precocemente, observando-se um aumento na resposta de anticorpos em 3-4 semanas após a infecção (WATERS et al., 2006).

Em um ensaio de ELISA indireto, utilizando 9 proteínas recombinantes como antígeno (ESAT-6, 14 kDa protein, MPT63, MPB70, MPB64, MPT51, MPB59, MTSA-

10, e MPB83), as proteínas recombinantes do complexo de *M. tuberculosis*, como CFP-10, Mb0143, PE13, TB10.4 e TB15.3 apresentaram resultados promissores (AMADORI et al., 2002).

Um estudo testou ESAT6, CFP-10, PE13, PE5, MPB70, TB10.4 e TB27.4, sendo que os antígenos ESAT6 e CFP-10 associados foram os antígenos com melhor desempenho, com sensibilidade entre 73 e 94% e especificidade entre 94 e 100%. Os antígenos TB10.4, PE13 e PE5 foram indicados para serem associados com ESAT-6 e CFP-10 e testados em estudos futuros (AAGAARD et al., 2006).

Em um experimento avaliando os antígenos (CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e uma quimera de ESAT-6 / MPB70 / MPB83) em um ensaio de ELISA indireto, apenas a quimera ESAT-6 / MPB70 / MPB83 apresentou concordância com o teste intradérmico, refletindo em 83,2% de sensibilidade e 86,5% de especificidade (SOUZA et al., 2012). A fusão dos antígenos MPB70/MPB83/ESAT-6 já havia sido testada no ELISA indireto, apresentando sensibilidade de 69,4% e especificidade de 96% (LIU et al., 2007).

Sayin e Erganis (2013) compararam os ensaios de ELISA utilizando como antígeno o derivado proteico purificado e sonicado de *M. bovis*. Dos 135 bovinos positivos no teste intradérmico, 62 (45,9%) e 43 (31,8%) foram positivos para PPD-ELISA e ELISA com sonicado, respectivamente. O isolamento em cultura foi utilizado como teste padrão ouro e a sensibilidade e especificidade destes dois métodos foram detectados como 48,2%-55,2% e 44,5%-31,2%, respectivamente.

Recentemente, o LAM foi utilizado como antígeno no ELISA e foi capaz de diferenciar animais infectados com *M. bovis* de animais expostos a tuberculose bovina e controles negativos, obtendo sensibilidade de 100% e uma especificidade de 91,7% (LAMONT et al., 2014a).

Um extrato etanólico de *M. bovis* foi utilizado como antígeno em um ensaio de ELISA indireto e testado em soros de bovinos e veados de cauda branca. Os

resultados mostraram que o teste detectou 77,2% dos bovinos infectados e 87,5% dos veados infectados por *M. bovis*, porém apresentou reação falso positiva em bovinos não infectados (WADHWA et al., 2014).

Recentemente, a proteína MPT83 de *M. tuberculosis* foi indicada para ser utilizada como antígeno em um ELISA indireto, baseado nos resultados de imunogenicidade e comparação com o ensaio de IFN- γ . Os resultados mostraram concordância positiva de 48,6% e negativa de 90% com IFN- γ (MENG et al., 2015).

Até então, a busca por novos antígenos de *M. bovis* têm sido incessante, embora ainda não exista um teste sorológico completamente eficiente. Esses ensaios sorológicos, além de complementar o teste intradérmico e IFN- γ (LIU et al., 2007; WHELAN et al., 2011), constituem uma alternativa para a triagem de infecção por *M. bovis* nos bovinos, podendo utilizar o mesmo soro coletado para outros estudos epidemiológicos, como para a brucelose, aumentando a cobertura diagnóstica da doença (SOUZA et al., 2012).

A metodologia de avaliação utilizada nos testes sorológicos tem sido baseada principalmente, na comparação isolada com outro teste de diagnóstico já existente. Entretanto, devido às diferenças de sensibilidade do teste de diagnóstico utilizado como referência, podem ocorrer falsas interpretações nos resultados. Isso demonstra que a comparação com testes isolados pode conotar a ideia de superioridade ou inferioridade de parâmetros como sensibilidade e especificidade. Assim, um teste sorológico deveria ser avaliado com base na comparação com vários testes de diagnóstico no mesmo estudo, a fim de estabelecer o verdadeiro *status* infeccioso dos animais.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V. *et al.* Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. **Preventive Veterinary Medicine**, v.96, n.3-4, p.161-169, 2010.
- AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V. *et al.* Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT-6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.4326-4335, 2006.
- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.1-17, 2005.
- ALEXANDER, K.A.; LAVER, P.N.; MICHEL, A.L. *et al.* Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.8, p.1296-9, 2010.
- ÁLVAREZ, J.; PEREZ, A.; BEZOS, J. *et al.* Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. **Veterinary Microbiology**, v.155, n.1, p.38-43, 2012.
- AMADORI, M.; LYASHCHENKO, K.P.; GENNARO, M.L. *et al.* Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v.85, p.379-89, 2002.
- AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, E.M.D.; RODRIGUEZ, C.A.R. *et al.* Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.241-244, 2008.
- ARANAZ, A.; DE JUAN, L.; BEZOS, J. *et al.* Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Research**, v.37, n.4, p.593-606, 2006.
- ARAÚJO, C.P.; OSÓRIO, A.L.A.R.; JORGE, K.S.G. *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using Nested-PCR for TbD1. **Plos One**, v.9, n.3, p.e91023, 2014.
- ASSEGED, B.; WOLDESENBET, Z.; YIMER, E. *et al.* Evaluation of abattoir inspection for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle at Addis Ababa abattoir. **Tropical Animal Health and Production**, v.36, n.6, p.537-46, 2004.
- BAHIENSE, L.; ÁVILA, L.N. de; BAVIA, M.E. *et al.* Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3549-3560, 2016. Suplemento 2.

- BARBIERI, J.M.; OLIVEIRA, L.F.; DORNELES, E.M.S. *et al.* Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil, 2013. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3531-3548, 2016. Suplemento 2.
- BENNETT, R.M.; COOKE, R.J. Costs to farmers of a tuberculosis breakdown. **Veterinary Record**, v.158, n.13, p.429-432, 2006.
- BIET, F.; BOSCHIROLI, M.L.; THOREL, M.F. *et al.* Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 411-436, 2005.
- BIET, F.; BOSCHIROLI, M.L. Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. **Research in Veterinary Science**, v.97, S69–S77, 2014.
- BLANCO, F.C.; BIGI, F.; SORIA, M.A. Identification of potential biomarkers of disease progression in bovine tuberculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.160, n.3-4, p.177-83, 2014.
- BOADELLA, M.; BARASONA, J.A.; DIAZ-SANCHEZ, S. *et al.* Performance of immunochromatographic and ELISA tests for detecting fallow deer infected with *Mycobacterium bovis*. **Preventive Veterinary Medicine**, v.104, n.1-2, p.160-164, 2012.
- BOUSSIOTIS, V.A.; TSAI, E.Y.; YUNIS, E.J. *et al.* IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **Journal of Clinical Investigation**, v.105, n.9, p.1317-25, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006, p.188, 2006. Disponível em:
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf. Acesso em 2 de maio de 2016.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Norma Interna SDA 02/2012: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, p.4, 2012.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Instrução Normativa N° 19, de 10 de outubro de 2016. Secretaria de Defesa Agropecuária, 4p. 2016.
- BUDDLE, B.M.; WILSON, T.; LUO, D. *et al.* Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis from milk samples from dairy cows. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.20, n.12, p.1812-1816, 2013.

- CARVALHO, R.C.; FURLANETTO, L.V.; MARUYAMA, F.H. *et al.* Evaluation of the efficiency of nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculosis-suspected lesions in post-mortem macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brazil. **Meat Science**, v.106, p.11-15, 2015.
- CASAL, C.; DÍEZ-GUERRIER, A.; ÁLVAREZ, J. *et al.* Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. **Veterinary Microbiology**, v.170, n.3-4, p.342-351, 2014.
- CASAL, C.; BEZOS, J.; DÍEZ-GUERRIER, A. *et al.* Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon- γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.105, n.1-2, p.149-154, 2012.
- CEZAR, R.D.S.; SILVA, N.L.; BATISTA FILHO, A.F.B. *et al.* Molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle herds of the state of Pernambuco, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v.12, n.31, p.1-6, 2016.
- CHAPINAL, N.; ELKIN, B.T.; JOLY, D.O. *et al.* Agreement between the caudal fold test and serological tests for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in bison. **Preventive Veterinary Medicine**, v.105, n.4, p.326-330, 2012.
- CHOI, Y.; JEON, B.Y.; SHIM, T.S. *et al.* Development of a highly sensitive one-tube nested real-time PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.80, n.4, p.299-303, 2014.
- COOK, G.M.; BERNEY, M.; GEBHARDET, S. *et al.* Physiology of Mycobacteria. **Advances in Microbial Physiology**, v.55, n.81-319, p.1-77, 2009.
- CORNER, L.A.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D.U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. **Veterinary Microbiology**, v.156, n.1-2, p.162-71, 2012.
- CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.53-63, 1994.
- DIAS, R.A.; STANOJLOVIC, F.M.U.; BELCHIOR, A.P.C. *et al.* Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of São Paulo, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3673-3684, 2016. Suplemento 2.
- DOMINGO, M.; VIDALA, E.; MARCO, A. Pathology of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v.97, p.S20–S29, 2014.
- EIRIN, M.E.; MACIAS, A.; MAGNANO, G. *et al.* Identification and evaluation of new *Mycobacterium bovis* antigens in the *in vitro* interferon gamma release assay for bovine tuberculosis diagnosis. **Tuberculosis**, v.95, n.6, p.795-801, 2015.

- EREQAT, S.; BAR-GAL, G. K.; NASEREDDIN, A. *et al.* Rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* by high-resolution melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4269-4272, 2010.
- ETCHECHOURY, I., VALENCIA, G.E., MORCILLO, N. *et al.* Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. **Zoonoses Public Health**, v.57, n.6, p.375-381, 2010.
- FARIAS, T.A.; ARAÚJO, F.R.; OSÓRIO, A.L.A.R. *et al.* ELISA based on recombinant MPB70 and p27 for detection of antibodies against *Mycobacterium bovis*. **Revista de patologia tropical**, v.41, n.2, p.155-162, 2012.
- FARNHAM, M.W.; NORBY, B.; GOLDSMITH, T.J. *et al.* Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.103, n.2-3, p.234-242, 2012.
- FERREIRA NETO, J.S.; SILVEIRA, G.B.; ROSA, B.M. *et al.* Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3385-3402, 2016. Suplemento 2.
- FLORES-VILLALVA, S.; SUÁREZ-GÜEMES, F.; ESPITIA, C. *et al.* Tuberculin skin test specificity is modified by the use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP10 in *Mycobacterium bovis* naturally infected cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.19, n.5, p.797-803, 2012.
- GALVIS, J.O.A.; GRISI-FILHO, J.H.H; COSTA, D. *et al.* Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3567-3578, 2016. Suplemento 2.
- GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.C. *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.13, p.7877-7.882, 2003.
- GCEBE, N.; MICHEL, A.; GEY VAN PITTIUS, N.C. *et al.* Comparative genomics and proteomic analysis of four non-tuberculous *Mycobacterium* Species and *Mycobacterium tuberculosis* complex: occurrence of shared immunogenic proteins. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.795, p.1-23, 2016.
- GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; FRANKEN, K.L.M.C. *et al.* Identification and characterization of the ESAT-6 homologue of *Mycobacterium leprae* and T-Cell Cross-Reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and immunity** v.70, n.5, p.2544-2548, 2002.
- GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; FRANKEN, K.L.M.C. *et al.* Immunological cross-reactivity of the *Mycobacterium leprae* CFP-10 with its homologue in *Mycobacterium tuberculosis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.59, n.1, p.66-70, 2004.

- GOODCHILD, A.V.; CLIFTON-HADLEY, R.S. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. **Tuberculosis**, v.81, n.1-2, p.23-41, 2001.
- GOOSEN, W.J.; COOPER, D.; MILLER, M.A. *et al.* IP-10 is a sensitive biomarker of antigen recognition in whole-blood stimulation assays used for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in African Buffaloes (*Syncerus caffer*). **Clinical and Vaccine Immunology**, v.22, n.8, p.974-8, 2015.
- GORMLEY, E.; DOYLE, M. B.; MCGILL, K. *et al.* The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, n. 4, p. 413-20, 2004.
- GOODCHILD, A. V.; DOWNS, S. H.; UPTON, P. *et al.* Specificity of the comparative skin test for bovine tuberculosis in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 177, n. 10, p. 258, 2015.
- GORMLEY, E.; DOYLE, M.B.; FITZSIMONS, T. *et al.* Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. **Veterinary Microbiology**, v.112, n.2-4, p.171-9, 2006.
- GORMLEY, E.; CORNER, L.A.L.; COSTELLO, E. *et al.* Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. **Research in Veterinary Science**, v.97, p.S30–S43, 2014.
- GREEN, L.R. JONES, C.C.; SHERWOOD, A.L. *et al.* Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.9, p.1309-1313, 2009.
- GREENWALD, R.; LYASHCHENKO, O.; ESFANDIARI, J. *et al.* Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. **Clinical and Vaccine immunology**, v.16, n.5, p.605-612, 2009.
- GUEDES, I.B.; BOTTENE, I. F. N.; MONTEIRO, L. A. R. C. *et al.* Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3579-3588, 2016. Suplemento 2.
- HIRPA, E.; AMENI, G.; LAWRENCE, J.C. *et al.* Performance evaluation of *Mycobacterium bovis* antibody test for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. **Academic Journal of Animal Diseases**, v.3, n.3, p.33-38, 2014.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária, Junho de 2016. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201601_publicacao_completa.pdf. Acesso em 10 de maio de 2016.
- JOLLEY, M.E.; NASIR, M.S.; SURUJBALLI, O.P. *et al.* Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. **Veterinary Microbiology**, v.120, n.1-2, p.113-121, 2007.

- JONES, G.J.; PIRSON, C.; HEWINSON, R.G. *et al.* Simultaneous measurement of antigen-stimulated interleukin-1 β and gamma interferon production enhances test sensitivity for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Clinical And Vaccine Immunology**, v.17, n.12, p.1946-1951, 2010.
- JONES, G.J.; WHELAN, A.; CLIFFORD, D. *et al.* Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 4, p. 620–622, 2012.
- KAROLEMEAS, K.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; COOPER, R. *et al.* Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. **Plos One**, v.7, n.8, p.e43217, 2012.
- KIM, M.H.; YANG, H.Y.; SUH, J.T. *et al.* Comparison of in-house PCR with conventional techniques and Cobas Amplicor *M. Tuberculosis*[™] Kit for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Yonsei Medical Journal**, v.49, n.4, p.537-544, 2008.
- KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L.A. *et al.* Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**, p.1-12, 2011.
- LAISSE, C.J.M.; GAVIER-WIDÉN, D.; RAMIS, G. *et al.* Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.5, p.1022-1027, 2011.
- LAMONT, E.A.; RIBEIRO-LIMA, J.; WATERS, W.R. *et al.* Mannosylated lipoarabinomannan in serum as a biomarker candidate for subclinical bovine tuberculosis. **BMC Research**, v.559, n.1-5, 2014a.
- LIMA, P.B.; NASCIMENTO, D.L.; ALMEIDA, E.C. *et al.* Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Pernambuco, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3601-3610, 2016. Suplemento 2.
- LIU, S.; GUO, S.; WANG, C. *et al.* A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v.87, n.3, p.212-217, 2007.
- LYADOVAAND, I.V.; PANTELEEV, A.V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarker. **Mediators of Inflammation**, p.1-13, 2015.
- LYASHCHENKO, K.P.; SINGH, M.; COLANGELI, R. *et al.* A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. **Journal of Immunological Methods**, v.242, n.1-2, p.91-100, 2000.
- LYASHCHENKO, K.P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J. *et al.* Tuberculosis in elephants: antibody responses to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, potential for early diagnosis, and monitoring of treatment. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n.7, p.722-732, 2006.

- LYASHCHENKO, K.P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J. *et al.* Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. **Veterinary Microbiology**, v.132, n.3-4, p.283-292, 2008.
- LYASHCHENKO, K.P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J. *et al.* Rapid detection of serum antibody by dual-path platform vetTB assay in white-tailed deer infected with *Mycobacterium bovis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.20, n.6, p.907-911, 2013.
- MEDEIROS, L.; MARASSI, C.D.; DUARTE, R.S. *et al.* Comparison of decontamination methods for primary isolation of *Mycobacterium bovis* in paucibacillary bovine tissues. **Letters in Applied Microbiology**, v.54, n.3, p.182-6, 2012.
- MENG, C.; WAN, T.; XU, Z. *et al.* Immunogenicity evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* MPT83 protein and establishment of serological diagnostic method for bovine tuberculosis detection. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v.55, n.2, p.220-6, 2015.
- MENZIES, F. D.; NEIL, S. D. Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. **The Veterinary Journal**, v.160, n.2, p.92-106, 2000.
- MENZIES, F.D.; ABERNETHY, D.A.; STRINGER, L.A. *et al.* A matched cohort study investigating the risk of *Mycobacterium bovis* infection in the progeny of infected cows. **The Veterinary Journal**, v.194, n.3, p.299-302, 2012.
- MICHEL, A. L. *Mycobacterium fortuitum* infection interference with *Mycobacterium bovis* diagnostics: natural infection cases and a pilot experimental infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 4, p. 501-503, 2008.
- MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P.D. *Mycobacterium bovis* at the animal human interface: A problem, or not?. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.371-381, 2010.
- MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D. *et al.* The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.111-124, 1994.
- MOSAVARI, N.; GERAVAND, M.M.; KEYVAN TADAYON, K. *et al.* Mycobacterial coinfection and persisting bovine tuberculosis - Has the time arrived for a policy review?. **International Journal of Mycobacteriology**, p.1-2, 2016.
- MUSTAFA, A. S. Characterization of a cross-reactive, immunodominant and HLA-promiscuous epitope of *Mycobacterium tuberculosis* specific major antigenic protein PPE68. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e103679, 2014.
- NÉSPOLI, J.M.B.; NEGREIROS, R.L.; AMAKU, M. *et al.* Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3589-3600, 2016. Suplemento 2.

NIEMANN, S.; HARMSSEN, D.; RÜSCH-GERDES, S. *et al.* Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.9, p.3231-3234, 2000.

NGANDOLO, B. N. R.; MÜLLER, B.; DIGUIMBAYE-DJAÏBE, C. *et al.* Comparative assessment of fluorescence polarization and tuberculin skin testing for the diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 89, n. 1-2, p. 81-89, 2009.

OIE. World Organization For Animal Health. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2015. v.1, chapter.2.4.6, 17p. Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BOVINE_TB.pdf> Acesso em 6 de maio de 2016.

PARK, H.T.; SHIN, M.K.; PARK, H.E. *et al.* PCR-based detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in South Korea using fecal samples. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.78, n.9, p.1537-1540, 2016.

PARSONS, S.D.C.; DREWE, J.A.; GEY VAN PITTIUS, N.C. *et al.* Novel Cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.19, n.12, p.2004–2007, 2013.

PARLENE, N.A.; BUDDLE, B.M. Immunity and vaccination against tuberculosis in cattle. **Current Clinical Microbiology Reports**, v.2, n.1, p.44-53, 2015.

PALMER, M.V.; WATERS, W.R.; WHIPPLE, D.L. Aerosol delivery of virulent *Mycobacterium bovis* to cattle. **Tuberculosis**, v.82, n.6, p.275-82, 2002.

POLLOCK, J.M.; NEILL, S.D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. **The Veterinary Journal**, v.163, n.2, p.115-127, 2002.

POLLOCK, J.M. RODGERS, J.D.; WELSH, M.D. *et al.* Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. **Veterinary Microbiology**, v.112, n.2-4, p.141-150, 2006.

QUAN, Z.; HAIMING, T.; XIAOYAO, C. *et al.* Development of one-tube multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detecting *Mycobacterium bovis*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, p.1-12, 2016.

QUEIROZ, M.R.; GROFF, A.C.M.; SILVA, N.S. *et al.* Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3647-3658, 2016. Suplemento 2.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. *et al.* **Clínica Veterinária**. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2002. 1737p.

- RAMOS, D.F.; SILVA, P.E.A.; DELLAGOSTINA, O.A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal of Biology**, v.75, n.4, p.830-837, 2015.
- REDDINGTON, K.; O'GRADY, J.; DORAI-RAJ, S. *et al.* Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.2, p.651-657, 2011.
- RHODES, S.G.; MCKINNA, L.C.; STEINBACH, S. *et al.* Use of antigen-specific interleukin-2 to differentiate between cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and cattle infected with *M. bovis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.21, n.1, p.39-45, 2014.
- RIBEIRO, L.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FRANCISCO, P.F.C. *et al.* Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3561-3566, 2016. Suplemento 2.
- ROCHA, W.V.; JAYME, V.S.; MOTA, A.L.A.A. *et al.* Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Goiás, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3625-3628, 2016. Suplemento 2.
- SA'IDU, A. S.; OKOLOCHA, E. C.; DZIKWI, A. A. *et al.* Public health implications and risk factors assessment of *Mycobacterium bovis* Infections among abattoir personnel in Bauchi State, Nigeria. **Journal of Veterinary Medicine**, p.1-5, 2015.
- SAYIN, Z; ERGANIS, O. Diagnosis of bovine tuberculosis by PPD-ELISA and Sonication-ELISA. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.68, n.3, p.181-184, 2013.
- SINCLAIR, J.A.; DAWSON, K.L.; BUDDLE, B.M. The effectiveness of parallel gamma-interferon testing in New Zealand's bovine tuberculosis eradication programme. **Preventive Veterinary Medicine**, v.127, p.94-99, 2016.
- SILVA, M.C.P.; GONÇALVES, V.S.P.; MOTA, A.L.A.A. *et al.* Prevalence and herd-level risk factors for bovine tuberculosis in the state of Paraná, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3611-3624, 2016. Suplemento 2.
- SKJØT, R.L.V.; BROCK, I.; AREND, S.M. *et al.* Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the *esat-6* gene family. **Infection and immunity**, v.70, n.10, p.5446-5453, 2002.
- SOUZA, I.I.F.; MELO, E.S.; RAMOS, C.A. *et al.* Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. **Springer Plus**, v.1, n.77, p.1-6, 2012.
- STEINBACH, S.; VORDERMEIER, H.M.; JONES, G.J. CD4+ and $\gamma\delta$ T cells are the main producers of IL-22 and IL-17A in lymphocytes from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. **Scientific Reports**, v.6, n.29990. p.1-10, 2016.

- TEKLU, A.; ASSEGED, B.; YIMER, E. *et al.* Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. **Revue scientifique et technique**, v.23, n.3, p.957-964, 2004.
- VAN INGEN, J.; RAHIM, Z.; MULDER, A. *et al.* Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.4, p.653-655, 2012.
- VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D. *et al.* Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.164–169, 2008.
- VELOSO, F.P.; BAUMGARTEN, K.D.; MOTA, A.L.A.A. *et al.* Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, p.3659-3672, 2016. Suplemento 2.
- VENDRAME, F. B.; AMAKU, M.; FERREIRA, F. *et al.* Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3639-3646, 2016. Suplemento 2.
- VORDERMEIER, H.M.; WHELAN, A.; COCKLE, P.J. *et al.* Use of Synthetic Peptides Derived from the Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.3, p.571-578, 2001.
- VORDERMEIER, H.M.; BROWN, J.; COCKLE, P.J. *et al.* Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP 10 at the T-cell epitope level. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, n.9, p.1203-1209, 2007.
- VORDERMEIER M.; AMENI, G.; BERG, S. *et al.* The influence of cattle breed on susceptibility to bovine tuberculosis in Ethiopia. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.35, n.3, p.227-237, 2012.
- VURAL, S.A.; TUNCA, R. Generalized tuberculosis in a 45 day-old calf. **Deutsche tierärztliche Wochenschrift**, v.108, n.11, p.468-70, 2001.
- WADHWA, A.; JOHONSON, R.E.; EDA, K. *et al.* Evaluation of ethanol vortex ELISA for detection of bovine tuberculosis in cattle and deer. **BMC Veterinary Research**, v.10, n.147, p.1-6, 2014.
- WATERS, W.R.; NONNECKE, B.J.; PALMER, M.V. *et al.* Use of recombinant ESAT-6:CFP10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, n.4, p.729-735, 2004.
- WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C. *et al.* Early Antibody Responses to Experimental *Mycobacterium bovis* Infection of Cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n.6, p.648-654, 2006.

- WATERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; VORDERMEIER, H.M. *et al.* Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in the Detection of Bovine Tuberculosis in Cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.18, n.11, p.1882-1888, 2011.
- WATERS, W.R.; MAGGIOLI, M.F.; PALMER, M.V. *et al.* Interleukin-17A as a Biomarker for Bovine Tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.23, n.2, p.168-180, 2016.
- WATRELOT-VIRIEUX, D.; DREVON-GAILLOT, E.; TOUSSAINT, Y. *et al.* Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v.53, n.7, p.321-325, 2006.
- WELSH, M.D.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, D.M. *et al.* Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**, v.114, n.1, p.101-111, 2005.
- WHELAN, C.; SHURALEV, E.; O'KEEFFE, G. *et al.* Multiplex Immunoassay for Serological Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.15, n.12, p.1834-1838, 2008.
- WHELAN, C.; CLIFFORD, D.; UPADHYAY, B. *et al.* Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.9, p.3176-3181, 2010.
- WHELAN, C.; SHURALEV, E.; KWOK, H.F. *et al.* Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.3, p.499-503, 2011.
- WOOD, P.R.; ROTHEL, J.S. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.125-135, 1994.
- WOOD, P.R.; JONES, S.L. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v.181, n.1-2, p.147-155, 2001.
- XIN, T.; JIA, H.; DING, J. *et al.* Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.20, n.4, p.482-490, 2013.
- ZUMÁRRAGA, M.J.; MEIKLE, V.; BERNARDELLI, A. *et al.* Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.3, p. 232-238.

Reações falso-negativas ao teste cervical comparativo para tuberculose bovina

False-negative reactions to the comparative intradermal tuberculin test for bovine tuberculosis

Rudielle A. Rodrigues¹, Ingrid I.F.S. Meneses², Klaudia S.G. Jorge¹, Gisele O.C. Leguizamón³, Márcio R. Silva⁴, Carlos A. N. Ramos¹, Lenita R. Santos³, Walter Lilenbaum⁵, Rodrigo N. Etges⁶, Flávio R. Araújo^{3*}

ABSTRACT.- Rodrigues R.A., Meneses I.I.F.S., Jorge K.S.G., Leguizamón G.O.C., Silva M.R., Ramos C.A.N., Santos L.R., Lilenbaum W., Etges R.N. & Araújo F.R. 2017. [False-negative reactions to the comparative intradermal tuberculin test for bovine tuberculosis] Reações falso-negativas ao teste cervical comparativo para tuberculose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00):00-00. Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia 830, Campo Grande, MS 79106-550, Brazil. E-mail: flabio.araujo@embrapa.br

In Brazil, according to the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), the routine tests for the diagnosis of bovine tuberculosis (bTB) are the simple intradermal tuberculin test (SITT), the caudal fold test (CFT) and the comparative intradermal tuberculin test (CITT). The latter is also used as a confirmatory test. A group of 53 animals from three dairy herds of an outbreak area for bTB that were submitted to depopulation in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, were submitted to CITT. The tissues of these animals were cultured and the resulting colonies confirmed by PCR and DNA sequencing. Of the 53 animals analyzed in the CITT, 32 (60.4%) were negative, 14 (26.4%) positive and seven (13.2%) inconclusive. The CITT detected 11 out of the 39 animals with culture-confirmed *M. bovis* infection as positive. From the total of 14 uninfected animals, based on culture, the CITT detected eight as negative. Thus, the CITT showed a sensitivity of 28.2% and a specificity of 57.1% for the sampled population. A total of 24/32 (75.0%) of the animals negative to CITT were culture positive (confirmed by PCR) and were considered false negative. The maintenance of these false-negative animals in the herds has serious implications for the control of the disease, since they can be a source of infection. The addition of complementary tests could help to identify these animals, increasing the diagnostic coverage.

INDEX TERMS: *Mycobacterium bovis*, Comparative Intradermal Tuberculin Test, bacteriological culture.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Senador Filinto Muler, n. 2443, Cidade Universitária, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Costa e Silva, S/N, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

³Laboratório de Imunologia, Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, n. 830, Zona Rural, CEP 70106-550, Campo Grande, MS, Brasil. *Autor para correspondência: flabio.araujo@embrapa.br.

⁴Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, n. 610, Dom Bosco, CEP 36038-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁵Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Hernani Mello, n.101, Niterói, RJ, Brasil.

⁶Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação, Avenida Getúlio Vargas, n. 1384, Menino Deus, CEP 90150-004, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO: No Brasil, segundo o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os testes de rotina para o diagnóstico de tuberculose bovina são o teste cervical simples (TCC), o teste da prega caudal (TPC) e o teste cervical comparativo (TCC), sendo que o último também é utilizado como teste confirmatório. Um grupo de 53 animais oriundos de três rebanhos leiteiros de área de foco para tuberculose bovina que foram submetidos a vazio sanitário no Rio Grande do Sul foi submetido ao TCC. Os tecidos destes animais foram cultivados e as colônias resultantes confirmadas por PCR e sequenciamento de DNA. Dos 53 animais analisados no TCC, 32 (60,4%) foram negativos, 14 (26,4%) positivos e sete (13,2%) inconclusivos, com base no PNCEBT. O TCC detectou como positivos 11 dos 39 animais com infecção por *M. bovis* confirmada por cultivo. Do total de 14 animais não infectados, baseado na cultura, o TCC detectou oito como negativos. Assim, o TCC apresentou, para a população amostrada, sensibilidade de 28,2% e especificidade de 57,1%. Um total de 24/32 (75,0%) dos animais negativos ao TCC foi positivo no cultivo (confirmado por PCR), sendo considerados falso-negativos ao TCC. A manutenção destes animais falso-negativos nos rebanhos tem sérias implicações para o controle da enfermidade, já que os mesmos podem ser fonte de infecção. A adição de testes complementares poderia auxiliar na identificação destes animais, aumentando a cobertura diagnóstica.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Mycobacterium bovis*, Teste Cervical Comparativo, cultivo bacteriológico.

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (TB) é uma enfermidade infecciosa de evolução crônica, causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium bovis*, que acomete muitas espécies domésticas e silvestres, principalmente bovinos e bubalinos, além de causar doença em humanos (Pesciaroli et al. 2014). A doença representa uma ameaça à saúde pública e causa perdas econômicas à pecuária, principalmente devido à eliminação dos bovinos infectados (Sa'idu et al. 2015). Além disso, a presença da doença nos rebanhos implica em barreira comercial à exportação de carne (Brasil 2012).

Em vários países, os programas de controle da tuberculose bovina se baseiam em identificar e remover os animais infectados. Para tal, utilizam-se principalmente do teste intradérmico, que se baseia na avaliação da hipersensibilidade tardia após a inoculação de antígeno micobacteriano, denominado derivado proteico purificado (PPD). Ainda que o teste intradérmico seja o método padrão recomendado para o diagnóstico de animais infectados com *M. bovis* (OIE 2015), são bem conhecidas suas limitações quanto à especificidade, devido a reações cruzadas com espécies de micobactérias não tuberculosas (Chen et al. 2014), ou quanto à sensibilidade, pela presença de animais em estágio avançado da doença, os quais tornam-se anérgicos (Whelan et al. 2011). Diante disso, é consenso que o teste intradérmico isoladamente pode não ser capaz de detectar todos os animais infectados com *M. bovis*, ocorrendo resultados falso-negativos no diagnóstico (Casal et al. 2014, Mosavari et al. 2016).

Apesar do sucesso de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina em diversas partes do mundo, ainda são frequentes os relatos de persistência de focos da doença após a implantação de programas de controle. Essa dificuldade pode se dever à reintrodução de bovinos infectados nos rebanhos, transmissão por animais silvestres/asselvajados, ou principalmente por falha na detecção de todos os animais infectados, os quais podem permanecer como reservatórios da TB e contaminar os demais animais (Conlan et al. 2012, Mosavari et al. 2016).

No Brasil, segundo o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os testes recomendados para o diagnóstico de tuberculose bovina são o teste cervical simples (TCC), o teste da prega caudal (TPC) e o teste cervical comparativo (TCC), sendo que o último também é utilizado como teste confirmatório. Preconiza-se que os animais que apresentem uma diferença dos aumentos da dobra da pele, provocados pela inoculação da PPD de *M. bovis* e da PPD de *M. avium*, igual ou superior a 4 mm (PPD de *M. bovis* - PPD de *M. avium*), sejam

considerados positivos para tuberculose (Brasil 2016). É bem conhecida a reação cruzada com micobactérias ambientais, as quais podem sensibilizar o animal e torná-lo positivo ao teste intradérmico, mesmo na ausência de infecção tuberculosa. Desta forma, assume-se ainda que a avaliação pareada das reações à PPD de *M. bovis* e PPD de *M. avium* aumentaria a especificidade do TCC, reduzindo a ocorrência de tais reações falso-positivas (Brasil 2006).

No entanto, apesar de mais específico, o TCC pode também apresentar problemas de baixa sensibilidade, não sendo capaz de identificar animais verdadeiramente infectados (Whelan et al. 2011). No presente estudo, demonstrou-se a ocorrência de reações falso-negativas ao TCC em rebanhos leiteiros infectados. A ocorrência da infecção foi demonstrada por meio do cultivo bacteriológico de lesões sugestivas de tuberculose, seguida de PCR e sequenciamento de DNA das colônias resultantes. Foram discutidos os impactos dos achados sobre o PNCEBT.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do Estudo. O estudo foi realizado entre os meses de dezembro de 2014 até março de 2015, com três rebanhos de bovinos dos municípios de Arroio do Meio e Bom Retiro do Sul, da microrregião Lajeado-Estrela, Rio Grande do Sul (Figura 1), que têm como exploração principal a pecuária leiteira. Um total de 53 animais de três rebanhos foi estudado, todos da raça holandesa e mantidos em sistema de criação semi-intensivo. Independentemente de seus resultados ao teste intradérmico, todos os animais foram abatidos e necropsiados, seguindo a determinação do Serviço Veterinário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul de realizar vazio sanitário, tendo fragmentos de tecidos e linfonodos cultivados para micobactérias. Colônias sugestivas de *M. bovis* foram confirmadas por PCR e sequenciamento de DNA.

Rebanhos e Animais. Dois dos três rebanhos estudados detinham certificação de estabelecimento de criação livre de tuberculose, sendo o rebanho A desde 2010 e B, desde 2013. O rebanho C não era certificado. Em 2014, o teste intradérmico rotineiro resultou na detecção de animais positivos nos três rebanhos, os quais foram abatidos. No ano de 2015, os três rebanhos sofreram vazio sanitário, na ocasião 38 animais do rebanho A, sete animais do rebanho B e oito animais do rebanho C, totalizando 53 animais.

Teste intradérmico. O Teste Cervical Comparativo (TCC) foi realizado segundo as normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT (Brasil 2016) O teste constou da injeção de 0,1 mL de PPD de *M. bovis* (bovPPD) e PPD de *M. avium* (avPPD) por via intradérmica, mantendo uma distância de 15 a 20 cm entre ambas as inoculações; sendo o avPPD inoculado cranialmente ao bovPPD no terço médio da região cervical. A leitura foi conduzida após 72 horas com um cutímetro, com base na avaliação da reação de hipersensibilidade no local da inoculação. O animal foi considerado positivo quando a reação ao bovPPD foi maior que 4,0 mm comparado com a reação ao avPPD. A notificação dos bovinos reagentes também foi realizada conforme as instruções do PNCEBT, para as Inspetorias de Defesa Agropecuária, que são, no Rio Grande do Sul, as Unidades Locais de Atendimento Veterinário.

Amostras. Todos os animais dos rebanhos infectados foram abatidos e necropsiados. Os abates dos animais foram realizados sob a supervisão do serviço de inspeção veterinária, sendo coletados fragmentos de tecidos de pulmão e glândula mamária, e linfonodos inteiros retrofaríngeos, intramamários, pulmonares e mesentéricos com ou sem lesões macroscópicas compatíveis com tuberculose, de todos os animais. Na ausência de lesões sugestivas de tuberculose, foram colhidos linfonodos hepáticos, mediastínicos, mesentéricos, retrofaríngeos e traqueobrônquicos. As amostras de tecidos foram coletadas e acondicionadas separadamente em sacos plásticos vedados, indicando o número do animal e o nome do órgão coletado. Em seguida, foram imediatamente acondicionados em frascos tampa de rosca, incluindo em cada um deles de dois a três conjuntos de tecidos, indicando no frasco os números dos animais de origem das frações dos órgãos coletados. Imediatamente após a coleta, as amostras foram congeladas para posterior remessa, sob refrigeração, em caixa isolante térmica, que foi inserida em caixa de papelão, indicando tratar-se de material infectante, cumprindo as normas determinadas pela Instrução de Embalagem P/650-IATA (*International Air Transport Association*).

Cultivo e identificação de *Mycobacterium bovis*. As amostras de tecidos foram mantidas congeladas a -30 °C até serem processadas. Para o processamento dos tecidos, foram macerados fragmentos de tecidos perimetrais (entre 10 e 25 mg) com 1,5 mL de água destilada estéril em aparelho *Magna Lyser* (Roche Life Science), submetidas à descontaminação por método de Petroff (Makovcova et al. 2015) e cultivadas em meio de cultivo *Stonebrink*, incubadas a 37°C e avaliadas durante 90 dias. As colônias sugestivas de *M. bovis* foram submetidas a PCR convencional com os iniciadores Mb.400, que amplificam um fragmento de 400 pares de bases (pb) que flanqueia a região de diferenciação 4 (RD4), ausente nesta espécie, porém presente em todos os demais membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* - CMT (Sales et al. 2014).

Purificação dos produtos da PCR. Os produtos das ampliações foram purificados em um volume total de reação de 10 uL cada, com 0,5 UI da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e 0,05 UI da enzima Exonuclease I (EXO) e incubados a 37°C por 30 minutos, seguido de 80°C por 20 minutos em termociclador MJ Mini (Biorad).

Sequenciamento de DNA. A reação de sequenciamento foi realizada com o *kit BigDye Terminator cycle sequencing* (versão 3.1, *Applied biosystems*, Foster city, CA, USA), em um volume total de reação de 10 uL, nas seguintes proporções: 1 uL de DNA (50 ng/uL); 5,8 uL de água ultrapura tipo 1; 2 uL de tampão; 0,5 uL de iniciador Mb.400R (5 mM) e 0,7 uL de *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix*. As ampliações foram realizadas em termociclador MJ Mini (Biorad), utilizando o seguinte programa: 96 °C por 1 min., seguido por 25 ciclos de 96°C por 10 seg., 50 °C por 5 seg. e 60 °C por 4 min. Em seguida, foi realizada uma etapa de purificação com EDTA (125 mM, pH 8,0), etanol 70% e etanol absoluto. Os produtos da PCR purificados foram sequenciados em um sequenciador automático modelo ABI-3130 (*Applied Biosystems*, USA).

Alinhamento local de sequências de DNA. O *base calling* das sequências de DNA foi realizado com o programa *Sequence Scanner* (*Applied Biosystems*) e as sequências resultantes foram submetidas à busca de identidade pelo Blastn (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Análise estatística. O grau de concordância entre cada dois testes foi avaliado de forma pareada pelo Teste de McNemar ou Teste exato de Fisher, os quais determinam se proporções pareadas são ou não diferentes. Foram considerados discordantes quando o teste apresentava valor de $p \leq 0,05$. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para medir o grau de correlação linear entre as duas medidas obtidas pareadas por animal: PPD de *M. bovis* e de *M. avium*. Foi gerada uma estimativa gráfica (curva de regressão) a partir dos pares de leituras (PPD de *M. bovis* e de *M. avium*) observados.

RESULTADOS

O TCC dos 53 animais detectou 14 (26,4%) animais positivos e sete (13,2%) inconclusivos. Ao abate, foram evidenciadas lesões sugestivas de tuberculose (LST) em algum órgão/tecido de 43 animais, sendo 13/14 animais com TCC positivo (92,9%), 5/7 inconclusivos (71,4%) e 25/32 (78,1%) animais com TCC negativo (Tabela 1). Pelo teste McNemar, houve uma discordância significativa entre resultados de TCC e de presença de LST ($p = 0,000006468$). Pelo *Odds Ratio* emparelhado, a chance de pares discordantes de animais positivos para LST e negativos para TCC foi de 25 vezes (IC95% 3,38-184,5) a chance de animais negativos para LST e positivos para TCC.

Dos 53 animais estudados, 39 (73,6%) se confirmaram como infectados por *M. bovis* pelo cultivo bacteriológico. Dos 43 animais cujos tecidos apresentaram LST, 39 (90,7%) foram positivos à cultura bacteriológica, enquanto todos os dez animais sem LST foram negativos. O TCC detectou como positivos 11 dos 39 animais com infecção por *M. bovis* confirmada por cultivo. Do total de 14 animais não infectados, baseado na cultura, o TCC detectou oito como negativos. Assim, o TCC apresentou, para a população amostrada, sensibilidade de 28,2% e especificidade de 57,1%. Um total de 24/32 (75,0%) dos animais negativos ao TCC foi positivo no cultivo (confirmado por PCR), sendo considerados falso-negativos ao TCC. (Tabela 1).

Todas as colônias sugestivas foram confirmadas por PCR convencional para a RD4. Realizou-se sequenciamento do fragmento de DNA que franqueia a RD4, resultante da PCR específica para *M. bovis*, em 12/24 animais que apresentaram cultivo positivo, porém TCC negativo. As sequências resultantes todas apresentaram como *best hit* o fragmento homólogo no isolado AF2122/97 de *M. bovis* (Sequence ID: LT708304), com identidades de 99 a 100%.

Pelo teste exato de Fisher, não houve diferença significativa entre a presença de LST e a ocorrência de cultivo positivo para *M. bovis* (p unicaudal = 0,12; p bicaudal = 0,25). A prevalência aparente da tuberculose bovina nos rebanhos deste estudo foi de 26,4%, com base no TCC. No entanto, a prevalência real, com base no cultivo confirmado por PCR, foi de 73,6%.

DISCUSSÃO

No Brasil, os únicos métodos preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) para diagnóstico *antemortem* da tuberculose bovina (TB) são os testes intradérmicos da prega caudal (TPC), cervical simples (TCS) e cervical comparativo (TCC). Na revisão do programa, este último teste, antes considerado confirmatório, utilizado em animais inconclusivos ao TCS e reagentes ao TPC (Brasil 2006), passou a ser considerado também como teste de rotina (Brasil 2016).

Sabe-se que a infecção por *M. bovis* desencadeia predominantemente uma resposta celular durante as fases iniciais e intermediárias da infecção, coordenada por linfócitos Th1. Dessa forma, os testes intradérmicos com PPD são baseados na detecção desta resposta celular (Schiller et al. 2010).

O TCS testa a resposta celular ao PPD de *M. bovis*, enquanto o TCC testa simultaneamente as reações intradérmicas ao PPD de *M. bovis* e PPD de *M. avium*. Sabe-se que as micobactérias ambientais podem interferir nos testes intradérmicos, por serem capazes de sensibilizar os animais, provocando reações inespecíficas ao PPD de *M. bovis* (Aranaz et al. 2006, Aagaard et al. 2010), devido a alguns antígenos comuns (Biet & Boschioli 2014). Desta forma, é esperado que o TCC apresente uma especificidade maior, quando comparado ao TCS, no diagnóstico da tuberculose bovina, justamente por detectar possíveis reações cruzadas às micobactérias ambientais. No que diz respeito à sua especificidade, a maior parte dos estudos que incluem abate e análise de fragmentos de tecidos revelam que o TCC apresenta adequada especificidade (>90%), tendo sido estimada em uma revisão entre 96-99% do Reino Unido (Monaghan et al. 1994) e média de 98,6% nos EUA (Farnham et al. 2012). Desta forma, é consenso a utilidade do TCC como método confirmatório da infecção por *M. bovis*.

Já no que diz respeito à sua sensibilidade e seu uso como método de triagem, os resultados são bastante diversos e, muitas vezes, insatisfatórios. Em estudo realizado no Reino Unido, que incluiu exame *post-mortem* de todos os animais do rebanho, a sensibilidade do TCC foi de 81% (IC 70-89%) (Karolemeas et al. 2012). A sensibilidade do TCC é frequentemente relatada como insatisfatória, com estimativas médias de 68-90% no Reino Unido (Monaghan et al. 1994) e média de 88,4% nos EUA (Farnham et al. 2012). Assim, a utilidade do TCC como método de triagem para a infecção por *M. bovis* é questionável e deve ser recomendado com cautela.

Vazios sanitários, em que todo o rebanho sofre abate, após falha no controle da tuberculose bovina, são uma oportunidade singular de avaliar parâmetros de qualidade de testes intradérmicos, uma vez que são gerados dados de cultivo de animais positivos e negativos aos mesmos (Karolemeas et al. 2012). O presente estudo empregou esta estratégia, permitindo confrontar dados das reações intradérmicas a PPD e cultivo bacteriológico das LST, com confirmação molecular das amostras bacterianas obtidas.

No presente estudo, resultados de TCC divergiram significativamente da detecção de LST ao abate, uma vez que foram detectadas LST em vários animais com TCC negativo, caracterizando o resultado falso-negativo do TCC e sua incapacidade de detectar tais animais comprovadamente infectados. A detecção de LST não divergiu significativamente do cultivo para *M. bovis*, o que reforça a recomendação de que animais abatidos com suspeita

de tuberculose bovina sejam sempre necropsiados e analisados cuidadosamente para a verificação de LST (Araújo et al. 2014, Ejeh et al. 2014). Não somente as LST geraram colônias sugestivas de *M. bovis*, como estas foram confirmadas por PCR, seguido por sequenciamento de DNA.

Apesar do baixo número de bovinos com resultados inconclusivos ao TCC, a maior parte deles apresentou LST e cultivos positivos para *M. bovis*, o que reforça a recomendação de que, em regiões de foco, animais inconclusivos podem evoluir para positivos com a progressão da doença e devem ser abatidos (Zarden et al. 2013).

Sem dúvida, o principal achado deste estudo foi que, dos 32 animais negativos ao TCC, 25 (78%) apresentaram LST e todos com exceção de um, foram confirmados por cultura bacteriológica, o método padrão de diagnóstico de tuberculose bovina. Este achado é surpreendente e alarmante, visto que se somente o TCC tivesse sido aplicado nestes rebanhos, tais animais teriam sido considerados negativos e manteriam a infecção no rebanho, disseminando-a para outros animais e para o homem. Adicionalmente, pode ocorrer a disseminação da tuberculose bovina para outras regiões, já que animais infectados podem ser comercializados com atestado negativo. Cabe ressaltar que dois dos três rebanhos examinados haviam sido certificados como livres de tuberculose bovina. Esta situação pode variar a depender da região estudada e desta forma, o TCC, embora continue representando uma excelente alternativa confirmatória em rebanhos acometidos de infecções por micobactérias ambientais, não se confirmou, nestes rebanhos estudados, como um adequado método de triagem para a tuberculose bovina.

Evidentemente, os achados para a população desse estudo não são necessariamente extrapoláveis para outras situações epidemiológicas. Recente estudo do nosso grupo evidenciou apenas 1/51 (1,9%) animal TCC negativo com cultivo positivo para *M. bovis* (Araújo et al. 2014).

Mesmo durante um foco, uma vez que um bovino é classificado como negativo pelos testes intradérmicos, não há recomendação para testes adicionais. Dessa forma, tais animais frequentemente não são abatidos e a investigação adicional desses animais é prejudicada, pela dificuldade em obter amostras de animais vivos. Embora tentativas de diagnóstico direto em amostras de animais vivos tenham sido realizadas com secreção nasal (de Souza Figueiredo et al. 2010) e com leite (Zarden et al. 2013, Bezerra et al. 2015), os resultados não são muito encorajadores, pela possibilidade dos animais apresentarem apenas lesões pulmonares fechadas ainda sem a presença do agente infeccioso nestes tecidos.

Sabe-se que a incapacidade de identificar todos os animais infectados prejudica o controle e erradicação da tuberculose bovina (Lahuerta-Marin et al. 2016). Neste estudo, a ocorrência de um alto percentual de reações falso-negativas ao TCC levou ao insucesso no controle dos surtos e a indicação de vazio sanitário. O uso paralelo de diferentes testes de diagnóstico *in vivo*, como a detecção de interferon-gama para a detecção da resposta mediada imune por células (Marassi et al. 2010, Lahuerta-Marin et al. 2016) e de testes sorológicos como o ELISA para a detecção da resposta humoral (Marassi et al. 2011, Casal et al. 2014) pode aumentar a cobertura diagnóstica conferida pelos testes intradérmicos e diminuir o impacto das falhas de diagnóstico sobre o controle da tuberculose bovina (Lahuerta-Marin et al. 2016).

CONCLUSÕES

O TCC apresentou baixa sensibilidade no diagnóstico da tuberculose bovina e um percentual elevado de animais com reações falso-negativas. A manutenção destes animais falso-negativos nos rebanhos tem sérias implicações para o controle da enfermidade, já que os mesmos podem ser fonte de infecção. A adição de testes complementares poderia auxiliar na identificação destes animais, aumentando a cobertura diagnóstica.

Agradecimentos. Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI/CNPQ/Universal (Processo: 443235/2014-7); FUNDECT/CNPq (TO: 085/2015) e Embrapa (Código SEG: 02.13.10.008.00.00) pelo financiamento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Gutiérrez-Pabello J.A., McNair J., Andersen P., Suárez-Güemes F, Pollock J., Espitia C. & Cataldi A. 2010. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev. Vet. Med.* 96:161-169.
- Aranaz A., De Juan L., Bezos J., Alvarez J., Romero B., Lozano F., Paramio J.L., López-Sánchez J., Mateos A. & Domínguez L. 2006. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 37:593-606.
- Araújo C.P., Osório A.L., Jorge K.S., Ramos C.A., Filho A.F., Vidal C.E., Roxo E., Nishibe C., Almeida N.F., Júnior A.A., Silva M.R., Neto J.D., Cerqueira V.D., Zumárraga M.J. & Araújo F.R. 2014. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. *PLoS One.* 9:1-6.
- Brasil 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 1-188.
- Brasil 2012. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Norma Interna SDA 02/2012: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, 1-4.
- Brasil 2016. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 19, de 10 de outubro de 2016. Secretaria de Defesa Agropecuária, 1-4.
- Bezerra A.V., Dos Reis E.M., Rodrigues R.O., Cenci A., Cerva C., & Mayer F.Q. 2015. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* Complexes by Real-Time PCR in Bovine Milk from Brazilian Dairy Farms. *J. Food Prot.* 78:1037-1042.
- Buddle B.M., de Lisle G.W., Griffin J.F. & Hutchings S.A. 2015. Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. *N. Z. Vet. J.* 63:19-27.
- Casal C., Díez-Guerrier A., Álvarez J., Rodríguez-Campos S., Mateos A., Linscott R., Martel E., Lawrence J.C., Whelan C., Clarke J., O'Brien A., Domínguez L. & Aranaz A. 2014. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet. Microbiol.* 170:342-351.
- Chen S., Parlane N.A., Lee J., Wedlock D.N., Buddle B.M. & Rehm B.H. 2014. New skin test for detection of bovine tuberculosis on the basis of antigen-displaying polyester inclusions produced by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:2526-2535.
- Conlan A.J., McKinley T.J., Karolemeas K., Pollock E.B., Goodchild A.V., Mitchell A.P., Birch C.P., Clifton-Hadley R.S. & Wood J.L. 2012. Estimating the hidden burden of bovine tuberculosis in Great Britain. *PLoS Comput. Biol.* 8:1-14.
- de Souza Figueiredo E.E., Carvalho R.C.T., Silvestre F.G., Lilienbaum W., Fonseca L.S., Silva J.T. & Paschoalin V.M.F. 2010. Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex PCR. *Braz. J. Microbiol.* 41:386-390.
- Ejeh E.F., Akinseye V.O., Igwe D., Adesokan H.K. & Cadmus S.I. 2014. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* in slaughtered cattle in North-Central Nigeria and the public health implications. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 43: 97-104.
- Farnham M.W., Norby B., Goldsmith T.J. & Wells S.J. 2012. Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. *Prev. Vet. Med.* 103:234-242.

- Karolemeas K., de la Rúa-Domenech R., Cooper R., Goodchild A.V., Clifton-Hadley R.S., Conlan A.J., Mitchell A.P., Hewinson R.G., Donnelly C.A., Wood J.L. & McKinley T.J. 2012. Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. *PLoS One*. 7:1-7.
- Lahuerta-Marin A., McNair J., Skuce R., McBride S., Allen M., Strain S.A., Menzies F.D., McDowell S.J. & Byrne A.W. 2016. Risk factors for failure to detect bovine tuberculosis in cattle from infected herds across Northern Ireland (2004-2010). *Res. Vet. Sci.* 107:233-239.
- Makovcova J., Babak V., Slany M. & Slana I. 2015. Comparison of methods for the isolation of mycobacteria from water treatment plant sludge. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 107:1165-1179.
- Marassi C.D., Medeiros L. & Lilenbaum W. 2010. The use of a Gamma-Interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. *Acta Trop.* 113:199-201.
- Marassi C.D., Medeiros L., McNair J. & Lilenbaum W. 2011. Use of recombinant proteins MPB70 or MPB83 as capture antigens in ELISAs to confirm bovine tuberculosis infections in Brazil. *Acta Trop.* 118:101-104.
- Monaghan M.L., Doherty M.L., Collins J.D., Kazda J.F. & Quinn P.J. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40:111-124.
- Mosavari N., Geravand M.M., Tadayona K. & Keshavarz R. 2016. Mycobacterial coinfection and persisting bovine tuberculosis—Has the time arrived for a policy review?. *Int. J. Mycobacteriol.* 5:S82–S83.
- OIE 2015. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2016. chapter. 2.4.6, 1:1-17. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BOVINE_TB.pdf>. Acesso em 6 de maio de 2016.
- Pesciaroli M., Alvarez J., Boniotti M.B., Cagiola M., Di Marco V., Marianelli C., Pacciarini M. & Pasquali P. 2014. Tuberculosis in domestic animal species. *Res. Vet. Sci.* 97:S78-S85.
- Sales M.L., Fonseca A.A. Jr., Sales E.B., Cottorello A.C., Issa M.A., Hodon M.A., Soares Filho P.M., Ramalho A.K., Silva M.R., Lage A.P. & Heinemann M.B. 2014. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. *Folia Microbiol.* 59:433-438.
- Sa'idu A.S., Okolocha E.C., Dzikwi A.A., Gamawa A.A., Ibrahim S., Kwaga J.K.P., Usman A. & Maigari S.A. 2015. Public health implications and risk factors assessment of *Mycobacterium bovis* infections among abattoir personnel in Bauchi State, Nigeria. *J. Vet. Med.* 2015:1-5.
- Schiller I., Oesch B., Vordermeier H.M., Palmer M.V., Harris B.N., Orloski K.A., Buddle B.M., Thacker T.C., Lyashchenko K.P. & Waters W.R. 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound Emerg. Dis.* 57:205-20.
- Trewby H., Wright D., Breadon E.L., Lycett S.J., Mallon T.R., McCormick C., Johnson P., Orton R.J., Allen A.R., Galbraith J., Herzyk P., Skuce R.A., Biek R. & Kao R.R. 2016. Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. *Epidemics*. 14:26–35.
- Whelan C., Shuralev E., Kwok H.F., Kenny K., Duignan A., Good M., Davis W.C. & Clarke J. 2011. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23:499-503.
- Zarden C.F., Marassi C.D., Figueiredo E.E. & Lilenbaum W. 2013. *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. *Vet. Rec.* 172:130.



Fig.1. Microrregião Lajeado-Estrela, do Estado do Rio Grande do Sul.

Tabela 1. Resultados do Teste cervical comparativo (TCC), presença de lesões sugestivas de tuberculose e cultura bacteriológica de bovinos da microrregião Lajeado-Estrela, Rio Grande do Sul.

Resultado TCC	LST +/cultivo +	LST +/cultivo -	LST -/cultivo +	LST -/cultivo -	Total
TCC +	11	2	0	1	14
TCC -	24	1	0	7	32
TCC inc.	4	1	0	2	7
Total	39	4	0	10	53

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, o teste cervical comparativo apresentou baixa sensibilidade na detecção de animais infectados, resultando em um alto percentual de animais com reações falso-negativas para tuberculose bovina, o que pode ter impacto negativo no controle de surtos da enfermidade. A permanência destes animais nos rebanhos contribui para disseminação de *M. bovis*, por serem considerados fonte de infecção. Com isso, para o controle e erradicação da tuberculose bovina, seria necessária a implementação de testes de diagnóstico complementares para identificação destes animais com tuberculose bovina.