

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Mycobacterium bovis*
POR ELISA**

*Evaluation of recombinant proteins for the detection of antibodies against
Mycobacterium bovis by ELISA*

Ingrid Ieda Fernando de Souza Meneses

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO DE 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Mycobacterium bovis*
POR ELISA**

*Evaluation of recombinant proteins for the detection of antibodies against
Mycobacterium bovis by ELISA*

Ingrid Ieda Fernando de Souza Meneses

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO DE 2012

Esta página será fornecida pela secretaria do curso.

*É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar ainda em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me
esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.*

Martin Luther King (1962-1968)

Ao Deus supremo...

Ao meu amado esposo, Alysson e a minha querida família Antônio Jr., Ieda, Idliana e Ithiel que sempre me dão força, segurança, coragem e sempre deram asas aos meus sonhos, permitindo-me voar!

Pelo amor e apoio incondicional...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Sua presença constante na minha vida, por me dar forças nos momentos difíceis e por esta oportunidade muito importante para minha vida profissional.

Ao meu esposo, Alysson Meneses da Silva, pelo amor, compreensão, paciência infinita e companheirismo de todos os dias. Muito obrigada, meu amor. Esta conquista é nossa!

A meus pais Ieda e Antônio Júnior e irmãos Idliana e Ithiel que apesar da distância sempre deram apoio incondicional. Amo muito vocês!

À minha família, em especial, meus avós, tia Lilian pelas mensagens de encorajamento a cada dia, me ajudando nos momentos bons como também nos difíceis desta minha jornada.

Aos meus amigos do grupo de oração, Chrysthian, Daiane, Kamili, Pr. Luciano, Maristela, Samuel, Cleiton, Denise, Geovanna, Renato, Yana que sempre estavam presentes e dispostos a me ajudar. Como também, sempre estavam em oração para eu conseguir mais esta vitória em minha vida!

Ao meu orientador, Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, pelos ensinamentos, dedicação e orientação. Muito obrigada por tudo e principalmente pela oportunidade.

Ao Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos pelas sugestões e amizade.

À Dra. Ana Luíza Alves Rosa Osório, pela ajuda nas coletas a campo, disponibilizando seu tempo para a realização deste trabalho.

Ao M.Sc. Carlos Eugênio Soto Vidal, pelas amostras biológicas cedidas e pela colaboração na escrita do artigo deste trabalho.

Aos colegas de laboratório (Thaís, Elaine, Lívia, Ana Beatriz, Letícia, Cristina), pela amizade e companheirismo.

Ao técnico Renato Henrique Marçal pelo auxílio no laboratório.

Ao Programa de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade e aos mestres pela dedicação, profissionalismo e pelo conhecimento compartilhado durante esses anos.

À Embrapa Gado de Corte, pela possibilidade de utilização dos laboratórios e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa (Macroprograma 2, processo 02.08.06.004).

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de pós-graduação (Processo 131746/2010-3 e 5580872010-8) e auxílio financeiro ao projeto de pesquisa (Processo505837/2008-0).

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul pelo auxílio financeiro ao projeto (Processo 33166700).

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

SOUZA, I. I. F. Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* por ELISA. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

A tuberculose bovina é uma importante doença infecciosa crônica causada pela bactéria *Mycobacterium bovis*, responsável por consideráveis perdas econômicas, além de constituir problema de saúde pública. Os programas de controle da enfermidade realizados na maioria dos países são baseados na identificação e eliminação de animais infectados. A utilização de um teste sorológico, como o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), pode incrementar a cobertura diagnóstica desta doença. Assim, o objetivo neste estudo foi produzir proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e uma quimera com fragmentos hidrofílicos de MPB70, MPB83 e ESAT-6 de *M. bovis* e avaliá-las como antígenos em ensaios ELISA. Os genes foram clonados no plasmídeo *pET-47b(+)*, com exceção de *mpb83*, clonado em *pRSET-C* e *tb10.4* clonado em *pET-28a (+)*, sendo expressos em *Escherichia coli* Rosetta. Após purificação por cromatografia de afinidade, as proteínas foram testadas por ELISA com 107 soros de bovinos positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC) e 126 soros de animais negativos ao TCC. Detectaram-se sensibilidades entre 28% e 83,2%; e especificidades entre 58,7% e 92,9%. Os testes com ESAT-6, MPB83 e PE5 tiveram concordância média (índices *kappa* de 0,447; 0,554 e 0,404, respectivamente) e a quimera, uma boa concordância (índice *kappa* de 0,688) com o TCC. Os testes com as demais proteínas tiveram concordâncias mínimas com o TCC. Sugere-se que a combinação do ensaio ELISA utilizando a quimera com os testes intradérmicos pode melhorar a cobertura diagnóstica da tuberculose bovina.

Palavras-chave: tuberculose bovina - proteínas recombinantes - CFP-10 - ESAT-6 - Mb0143 - MPB83 - PE5 - PE13 - TB10.4 - TB15.3 - Quimera - ELISA.

ABSTRACT

SOUZA, I. I. F. Evaluation of recombinant proteins for the detection of antibodies against *Mycobacterium bovis* by ELISA. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

Bovine tuberculosis is an important chronic infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*, responsible for considerable economic losses, and represents a problem of public health. The control programs conducted in most countries, including Brazil, are based on identification and slaughtering of infected animals. The use of a serologic test, such as Enzyme Immunosorbent Assays (ELISAs), could improve the diagnostic coverage of bovine tuberculosis. Based on that, the aims of this work were to produce and purify recombinant proteins CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 and a chimera with fragments hydrophilic of MPB70, MPB83 and ESAT-6 of *M. bovis*, and evaluated them as antigens in ELISAs. The coding genes for these proteins were cloned into plasmid *pET-47b(+)*, except *mpb83*, cloned into *pRSET-C* and *tb10.4*, cloned into *pET-28a (+)*, expressed using *Escherichia coli Rosetta* cells. After purification by affinity chromatography, proteins were tested in ELISA with 107 sera from cattle positive for tuberculosis by comparative intradermal tuberculin test (CITT) and 126 sera from cattle negative by CITT. Sensitivities between 28% and 83.2% and specificities between 58.7% e 92.9% were detected. The ELISAs with ESAT-6, MPB83, PE5 showed medium agreement (*kappa indexes* of 0.447; 0.554; 0.404, respectively) and the chimera showed a good agreement (*kappa index* of 0.668) with CITT. The tests with the others proteins showed a minimal agreement with CITT. The combination of ELISA with chimera of ESAT-6/MPB70/MPB83 and intradermal tuberculin test could improve the diagnostic coverage of bovine tuberculosis.

Keywords: bovine tuberculosis - recombinant proteins - CFP-10 - ESAT-6 - Mb0143 - MPB83 - PE5 - PE13 - TB10.4 - TB15.3 - Quimera - ELISA.

SUMÁRIO

	“Página”
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 TUBERCULOSE	12
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E EM SAÚDE PÚBLICA	12
2.2 ETIOLOGIA.....	13
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	15
2.3.1 Hospedeiros	15
2.3.2 Transmissão	16
2.3.3 Distribuição.....	17
2.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	20
2.5 IMUNIDADE	21
2.6 DIAGNÓSTICO	24
2.6.1 Métodos Diretos para Detecção de <i>Mycobacterium bovis</i>	24
2.6.2 Métodos Indiretos para Detecção de <i>Mycobacterium bovis</i>	27
2.6.2.1 Testes intradérmicos.....	27
2.6.2.2 Teste de Interferon-gama (IFN- γ)	29
2.6.2.3 Teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e antígenos promissores para detecção de anticorpos contra <i>Mycobacterium bovis</i>	30
2.7 MEDIDAS DE CONTROLE	34
REFERÊNCIAS	36
Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra <i>Mycobacterium bovis</i> por ELISA	46
RESUMO.....	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAIS E MÉTODOS	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
AGRADECIMENTOS	54
REFERÊNCIAS	54
TABELAS	57
FIGURAS	60

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma enfermidade infecciosa crônica e debilitante causada pela bactéria *Mycobacterium bovis* (KARLSON; LESSEL, 1970; WOBESER, 2009). Esta enfermidade constitui um grave problema de saúde pública (ETTER et al., 2006) e estima-se que cause prejuízos anuais no mundo na ordem de três milhões de dólares (BUDDLE et al., 2011; GARNIER et al., 2003).

A ocorrência da tuberculose bovina é baixa nos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e outros países da Europa (SCHILLER et al., 2011; THOEN; LOBUE; DONALD, 2009) e no Brasil pouco se conhece sobre a situação epidemiológica dessa enfermidade (GRISI FILHO et al., 2011) sendo que a prevalência em 1976 foi de 2,6% (SCHENK; SCHENK, 1982) e os dados de notificações oficiais mais atualizados indicam a prevalência média nacional de 1,3% (BRASIL, 2006). No estado de Mato Grosso do Sul Schenk e Schenk (1982) recolheram dados de 1.714.916 bovinos procedentes de 49 municípios e observaram uma prevalência de 0,2% de bovinos com tuberculose em abatedouros, no período de 1974 a 1979. Um levantamento realizado no período de maio a novembro de 2003, com o objetivo de rastrear a infecção por *M. bovis* em rebanhos de corte também no estado de Mato Grosso do Sul, observaram que dos 483.047 bovinos que foram abatidos em matadouros frigoríficos, houve 63 condenações de carcaças (0,013%), sendo que dessas, 74,6% envolveram lesões granulomatosas (ALMEIDA, 2004).

Na pecuária brasileira, essa doença acarreta perdas econômicas estimadas em 10% para a produção de leite e 20% para a produção de carne (PINTO et al., 2002), assim como infertilidade e condenação de carcaças (OLIVEIRA et al., 2007). Além disso, a presença da enfermidade nos rebanhos torna os produtos resultantes da pecuária vulneráveis as barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010).

Os programas de controle da enfermidade realizados na maioria dos países, inclusive no Brasil, são baseados na identificação e eliminação de animais infectados (teste-abate), tomando como base a tuberculinização intradérmica (MEDEIROS et al., 2010), que fornece uma resposta celular através de reações de hipersensibilidade tardia evidenciada por um edema no local de inoculação da tuberculina (POLLOCK et al., 2006).

Porém, os testes de tuberculinização possuem limitações pois podem ocasionar resultados falso-positivos devido à ocorrência de reações cruzadas com outras micobactérias como, por exemplo, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium avium paratuberculosis* e *Nocardia farcinus* que levam ao abate desnecessário desses animais (FRÁGUAS et al., 2008; LILENBAUM, 2000; MEDEIROS et al., 2010), e falso-negativos em animais anérgicos, principalmente quando se têm infecções avançadas. Além disso, os animais que foram submetidos à tuberculinização ficam dessensibilizados, ou seja, com capacidade diminuída em responder a novos testes, devido a redução da atividade imunológica e reativa do animal (MONAGHAN et al., 1994). Dessa forma, a confirmação de animais reativos através de outros métodos torna-se necessária para garantir a confiabilidade do diagnóstico (FRÁGUAS et al., 2008).

Diversos antígenos e tipos de ensaios sorológicos têm sido propostos para o diagnóstico da tuberculose bovina, com distintos graus de sucesso (LIGHTBODY et al., 1998; LIGHTBODY et al., 2000; SURUJBALLI et al., 2002). Dentre esses, os ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) apresentam claras vantagens, como possibilidade de testar um grande número de amostras em curto espaço de tempo e a automação na obtenção dos resultados (SOARES, 2001). Os primeiros testes com a técnica do ELISA para diagnóstico da tuberculose bovina empregaram derivado protéico purificado (*purified protein derivative*, PPD) ou antígeno bruto. Porém, os resultados não foram satisfatórios, pois apresentaram baixa especificidade e sensibilidade (AUER, 1987).

Há diversos estudos sobre os antígenos específicos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* preferencialmente reconhecidos pela resposta humoral em bovinos infectados por *M. bovis*, tais como MPB70, MPB63, MPB83 e ESAT-6 (AMADORI et al., 2002; HARBOE et al., 1990; LYASHCHENKO et al., 1998).

Com o advento do sequenciamento genômico de *M. bovis*, foi possível conhecer sequências de nucleotídeos dos genes que codificam para antígenos potencialmente promissores para testes humorais ou celulares, que podem contribuir para um diagnóstico mais preciso da tuberculose bovina (GARNIER et al., 2003).

Assim, o objetivo neste estudo foi produzir proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e uma quimera com fragmentos hidrofílicos de MPB70, MPB83 e ESAT-6 de *M. bovis* e avaliá-las como antígenos em ensaios ELISA.

2 TUBERCULOSE

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E EM SAÚDE PÚBLICA

A importância econômica atribuída à tuberculose bovina está relacionada com as perdas diretas resultantes da morte de animais, da queda no ganho de peso, diminuição da produção de leite, do descarte precoce e eliminação de animais de alto valor zootécnico, (MARQUES; MAIA JUNIOR; ZAPPA, 2008) infertilidade e a condenação de carcaças no momento do abate (OLIVEIRA et al., 2007). Como também está baseada na perda de prestígio e credibilidade da unidade de criação onde a doença é constatada (MARQUES; MAIA JUNIOR; ZAPPA, 2008).

Estima-se que os prejuízos anuais no mundo com a tuberculose bovina são da ordem de três milhões de dólares (GARNIER et al., 2003). No Brasil, esta doença acarreta perdas econômicas na pecuária estimadas em 10% para a produção de leite e 20% para a produção de carne bovina (PINTO et al., 2002). Além disso, a presença da enfermidade nos rebanhos torna os produtos resultantes da pecuária vulneráveis as barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010).

O processo de desenvolvimento e intensificação dos sistemas de produção pecuária tem aumentado o aparecimento de novos casos da tuberculose bovina, principalmente em rebanhos leiteiros, pois o confinamento propicia a difusão da doença e o contato direto entre os animais resulta num aumento na predisposição à infecção (ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005).

Em rebanhos de corte a prevalência da doença é menor, pois são criados em sistema extensivo e abatidos precocemente, diminuindo o tempo de exposição aos bovinos infectados. (ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005) Entretanto, não estão livres da infecção que pode ocorrer em casos em que o trânsito e o comércio de bovinos são praticados de forma intensiva aumentando o contato entre os animais, ou onde exista proximidade de rebanhos de corte e de leite com bovinos portadores da doença (JORGE; ALMEIDA et al., 2004). Em um levantamento realizado no período de maio a novembro de 2003 com o objetivo de rastrear a infecção por *M. bovis* em rebanhos de corte do estado de Mato Grosso do Sul (MS) constatou-se que de 483.047 bovinos abatidos em matadouros frigoríficos, 63 (0,013%) carcaças foram

condenadas. Dessas, 47 (74,6%) apresentaram lesões granulomatosas, 11 (17,5%) apresentaram abscessos e 5 (7,9%) foram inconclusivas ao exame histopatológico (ALMEIDA, 2004).

2.2 ETIOLOGIA

O gênero *Mycobacterium* pertence à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales e já foram descritas mais de 120 espécies (SMITH et al., 2009).

A tuberculose bovina tem como agente etiológico a espécie *Mycobacterium bovis* que faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), constituído também pelas espécies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* (NIEMANN et al., 2000) além de *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii* e *Mycobacterium caprae* (CHIMARA; FERRAZOLI; LEÃO, 2004; COUSINS et al., 2003).

As micobactérias são bacilos curtos e sem mobilidade, aeróbios estritos, não esporulados, não capsulados, não flagelados, não produtores de toxinas e são intracelulares facultativos (CORNER, 1994; LAGE et al., 1998).

A parede celular das micobactérias é constituída de lipídeos, como ácidos micólicos e micosídeos e por polipeptídios (CORNER, 1994; TURENNE; WALLACE; BEHR, 2007). É formada pela membrana citoplasmática em sua face interna, uma camada intermediária de peptidoglicanos e uma camada externa de ácidos micólicos que estão ligados covalentemente ao arabinoglicano, formando o complexo micolilarabinogalactano (BRENNAN; NIKAIDO, 1995). Esse complexo dificulta a captação de nutrientes pela micobactéria, o que retarda o seu crescimento e também a torna resistente a compostos hidrofílicos e à dessecação (CORNER, 1994). Essa parede celular rica em lipídeos pode explicar a alta resistência das micobactérias a antibióticos.

As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e sua identificação é feita pelo método de Ziehl-Neelsen (VITALE et al., 1998). Esta técnica baseia-se na coloração pela fucsina a quente que confere aos BAAR uma cor avermelhada. A fucsina consegue entrar na bactéria devido à ação do calor e os ácidos micólicos conferem resistência à descoloração por álcool-ácido (BENTO et al., 2011). Apresentam-se como cocobacilos, medindo de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1,5 a 3 µm de comprimento (THOEN; LOBUE;

DONALD, 2009).

A técnica de fluorescência permite uma melhor visualização das micobactérias do que o método de Ziehl-Neelsen. A fluorescência com a coloração pela auramina confere uma visualização com luz ultravioleta dos BAAR como bacilos amarelo-fluorescentes e resistem à descoloração por álcool ácido (RICHARDS, 1941).

O genoma dos membros do complexo MTB é mais extenso se comparado ao genoma de outros microrganismos intracelulares, com aproximadamente 4,4 milhões de pares de bases (SPRINGER et al., 2004), contendo 61-71% de Guanina e Citosina (MIKKELSEN et al., 2011). As diferenças filogenéticas entre os representantes deste complexo são muito pequenas, tornando difícil a sua diferenciação (MODA et al., 1996). Por exemplo, *M. bovis* possui uma estreita relação com *M. tuberculosis*, cujos genomas apresentam mais de 99,95% de similaridade (GARNIER et al., 2003).

Mycobacterium avium é o causador da tuberculose nas aves (BIET et al., 2005; TURENNE; WALLACE; BEHR, 2007) e é integrante do complexo MAIS (*M. avium*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*), que pode causar linfadenite granulomatosa com o desenvolvimento de lesões nos linfonodos do trato gastrointestinal de suínos, que leva a sérias perdas no abate desses animais. Essas micobactérias não são patogênicas para os bovinos e bubalinos; entretanto, provocam reações inespecíficas à tuberculinização, dificultando o diagnóstico da tuberculose nessas espécies (BRASIL, 2006).

Micobactérias saprófitas ou atípicas têm sido identificadas como causadoras de doenças em animais e humanos. Estas fazem parte do complexo das micobactérias não tuberculosas - MOTT (*mycobacteria other than tuberculosis*), chamadas genericamente de micobacterioses. Destacam-se *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei* e *Mycobacterium chelonae* (LAGE et al., 1998; THOEN; KARLSON; HIMES, 1981). É importante salientar que *Mycobacterium avium paratuberculosis* pode causar paratuberculose em bovinos, sem desenvolver sinais clínicos e pode permanecer como uma infecção latente durante anos (MIKKELSEN et al., 2011; THOREL; KRICHEVSKY; LEVY-FRÉBAULT, 1990).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

2.3.1 Hospedeiros

Mycobacterium bovis pode ter diferentes localizações em seus hospedeiros, tornando-se, assim, um modelo epidemiológico de transmissão complexo dentre os microrganismos patogênicos (NEILL et al., 1994). O hospedeiro da tuberculose causada por *M. bovis* é o bovino (WOBESER, 2009), mas várias espécies como os animais domésticos, selvagens e o homem são susceptíveis a este microrganismo (BUDDLE et al., 2011; GOOD; DUGNAN, 2011).

Antigamente dava-se pouca importância a essas fontes de infecção, porém, a eliminação gradativa da tuberculose nos bovinos tem enfatizado que animais silvestres infectados possibilitam a persistência da tuberculose bovina, ocasionando a reintrodução da doença em rebanhos livres da infecção (ABRAHÃO, 1999), além de ser um risco para a saúde pública (BUDDLE et al., 2011). Como consequência, causa prejuízos econômicos e dificuldades na reposição de animais exóticos raros (ABRAHÃO, 1999).

Animais domésticos ou silvestres podem ser considerados tanto como hospedeiros disseminadores ou hospedeiros de manutenção (reservatórios) de *M. bovis* (BIET et al., 2005; BUDDLE et al., 2011).

Os hospedeiros disseminadores que incluem os pequenos ruminantes, equídeos, felídeos, canídeos e suídeos se infectam após exposição a *M. bovis* (BIET et al., 2005). Porém, esses animais só serão capazes de manter a infecção na espécie se houver um hospedeiro mantenedor no ecossistema, ou seja, se a fonte de infecção for removida a prevalência é reduzida e só pode ser mantida em longo prazo por reinfecção a partir de outra fonte. Em hospedeiros de manutenção a infecção pode persistir por transferência horizontal mesmo na ausência de qualquer outra fonte de *M. bovis* (BUDDLE et al., 2011).

Os hospedeiros mantenedores da infecção são os bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus*, no mundo inteiro, búfalo asiático (*Bubalus bubalis*) principalmente na Austrália, o búfalo africano (*Syncerus caffer*) na África equatorial (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994), o bisão americano (*Bison bison*), o veado-vermelho (*Cervus elaphus*) no Canadá (NISHI; SHURY; ELKIN, 2006), o javali (*Sus scrofa*) na Espanha (NARANJO et al., 2008), o veado-da-cauda branca (*Odocoileus virginianus*) em Michigan (EUA), o marsupial (*Trichosurus*

vulpecula) na Nova Zelândia e o furão (*Meles meles*) no Reino Unido e Irlanda (DE LISLE et al., 2002). Esses animais são considerados fonte de infecção para animais domésticos e também podem causar problemas nos parques e propriedades de caça (BUDDLE et al., 2011). No Brasil e na Argentina, onde a tuberculose bovina é um problema importante, a infecção de porcos domésticos por *M. bovis* é comum e representa um reservatório adicional da doença (GUTIÉRREZ; TELLECHEA; GARCÍA MARÍN, 1998; MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994). O javali (*Sus scrofa*) é considerado um importante reservatório de infecção por *M. bovis* em parques nacionais e fazendas de caça no sul da Espanha, pois ele pode agir como fonte de infecção para outros animais (NARANJO et al., 2008).

2.3.2 Transmissão

Nos rebanhos, a infecção por *M. bovis* depende de vários fatores incluindo a frequência de excreção, via de infecção, a carga infectante, o período de transmissibilidade e a suscetibilidade do hospedeiro (GOOD; DUIGNAN, 2011). Assim, a presença de um bovino infectado com o bacilo da tuberculose aumenta a possibilidade da propagação da doença dentro de um rebanho (MENZIES; NEILL, 2000; OLEA-POPELKA et al., 2008).

A inalação do bacilo é a rota mais importante na infecção de bovinos (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010; POLLOCK; NEILL, 2002) sendo que a contaminação por esta via é responsável por 80-90% de tuberculose nestes animais (ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005) e afeta principalmente os pulmões (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010). Dessa forma, a prevalência de altas taxas da tuberculose bovina transmitida por aerossóis, é facilitada pela convivência natural em rebanhos com alta densidade animal e movimento deles dentro da propriedade, entre propriedades e por meio de eventos agropecuários como feiras e leilões (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010; MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994). Um único bacilo transportado no interior de uma gotícula é suficiente para estabelecer a infecção no pulmão do bovino (MENZIES; NEILL, 2000).

A ingestão do bacilo pode ser considerada a via secundária mais comum de infecção (MENZIES; NEILL, 2000). A via orofaríngea é muito importante em relação a alimentação de bezerros em vacas tuberculosas (PALMER; WATERS, 2006).

Além da disseminação da tuberculose bovina pelas vias respiratória e digestória,

outras vias menos usuais são: corrimento nasal, fezes, urina, secreção vaginal, secreção uterina e sêmen de animais infectados transmitindo, assim, a doença aos animais suscetíveis (RUGGIERO et al., 2007; MURAKAMI et al., 2009).

Grande quantidade de bacilo é eliminada para o meio ambiente pelas fezes e pela urina. No entanto, pastos e cochos contaminados tem pouca importância na transmissão da doença (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994).

Em relação à infecção congênita, a transmissão se dá a partir do útero contaminado da mãe, por meio dos vasos umbilicais. Em raras ocasiões, quando o sêmen e os órgãos sexuais do macho ou da fêmea estão infectados, pode ocorrer transmissão genital. O uso de soluções contaminadas na glândula mamária resulta em transmissão iatrogênica (NEILL et al., 1994).

A ocorrência de tuberculose humana causada por *M. bovis* é resultado da inalação de aerossóis ou da ingestão de leite contaminado (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010; THOEN; LOBUE; DE KANTOR, 2006). Em locais onde a prevalência do HIV é alta, os indivíduos são mais suscetíveis a infecção por micobactérias (LOBUE; ENARSON; THOEN, 2010).

É importante que a saúde dos trabalhadores de propriedades que possuem rebanhos seja rotineiramente monitorada, pois eles vivem em íntimo contato com animais e estariam mais expostos à infecção (ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005). Trabalhadores de zoológicos que estão em contato com os animais selvagens, também podem se infectar mais facilmente com o bacilo (ABRAHÃO, 1999).

2.3.3 Distribuição

A tuberculose bovina possui distribuição mundial (THOEN; LOBUE; DONALD, 2009) sendo que a maior prevalência está em países em desenvolvimento e encontra-se erradicada ou em fase de erradicação na maior parte dos países desenvolvidos (BRASIL, 2006). Sua ocorrência concentra-se principalmente em criações intensivas como, por exemplo, na bovinocultura de leite, sendo mais comum em locais no qual a supervisão veterinária é inadequada, como é o caso da maioria dos países em desenvolvimento (COSIVI et al., 1998).

Em países em que não é realizado o controle efetivo da tuberculose, a taxa de morbidade em bovinos situa-se em torno de 8% a 10% e a letalidade natural pode chegar a 50%, uma vez que os animais de corte são abatidos precocemente, não oportunizando o desenvolvimento do quadro crônico da tuberculose (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994). Já nos países que possuem programas de controle da doença e tem como diagnóstico os testes tuberculínicos e eliminação dos animais reativos, a prevalência da doença diminuiu consideravelmente (GOOD; DUIGNAN, 2011; THOEN; LOBUE; DONALD, 2009).

Na Europa houve relatos que a prevalência de gados infectados já atingiu níveis elevados chegando a 50% (THOEN; LOBUE; DONALD, 2009), sendo que a República da Irlanda e o Reino Unido tem uma prevalência de 4,4% e 3,3% respectivamente. Em 2006, os países europeus considerados livres da tuberculose bovina foram Bélgica, República Tcheca, Dinamarca, França, Finlândia, Alemanha, Luxemburgo, Holanda, Eslováquia, Suécia e Noruega (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2009).

Na Ásia, aproximadamente 47% dos países relataram ocorrência da tuberculose bovina, 27% não relataram esta enfermidade e 25% não possuem dados sobre este assunto. É importante ressaltar que 94% da população bovina e 99% da bubalina asiática estão em regiões nas quais a tuberculose não tem nenhum controle ou tem apenas um controle parcial (COSIVI et al., 1998).

Na África aproximadamente 55% dos países relataram a ocorrência da tuberculose bovina, 8% não relataram esta enfermidade e 33% não possuem dados sobre este assunto (COSIVI et al., 1998). Uma pesquisa realizada em Torodi, Nigéria, confirmou que a tuberculose bovina é endêmica naquela região e o risco da transmissão para humanos é relativamente alto, pois não há um programa de controle efetivo neste país (BOUKARY et al., 2011). Somente sete países da África aplicam o teste abate para o controle desta zoonose (COSIVI et al., 1998).

É provável que a tuberculose bovina tenha sido introduzida nas Américas no período colonial devido a importação de bovinos tuberculosos (THOEN; LOBUE; DONALD, 2009). Há aproximadamente 374 milhões de bovinos na América Latina e Caribe, sendo que 70% desses animais estão mantidos em áreas no qual as taxas de infecção com *M. bovis* são superiores a 1% da população bovina e 30% estão em países onde a infecção afeta menos de 1% do gado (DE KANTOR; RITACCO, 2006).

Nos Estados Unidos, as campanhas de controle se iniciaram no ano de 1917 e permanece até hoje, sendo que o evento mais importante foi à inspeção obrigatória de carne em matadouros para detectar o gado com tuberculose, pois no momento do abate cerca de 200 mil carcaças foram retidas das quais 50 mil foram totalmente condenadas em menos de 10 milhões de animais inspecionados. No Canadá, o programa foi criado em 1923, porém, a inspeção de carcaças já era realizada desde 1907 no momento em que a prevalência da doença foi estimada em 4% (ESSEY; KOLLER, 1994). Atualmente, são considerados países de incidência reduzida e possuem programas de controle para esta enfermidade (BRASIL, 2006).

Na Venezuela, em 2003, foi realizada uma pesquisa em várias regiões do país. Realizou-se o teste de tuberculinização em 707.693 bovinos dos quais 0,04% foram reagentes. No Uruguai, a campanha oficial para o controle e erradicação da tuberculose bovina iniciou-se em 1996. Em 2007, foram notificados cinco surtos da doença e em todos os casos os animais foram abatidos e as carcaças foram destruídas (DE KANTOR et al., 2008).

No Brasil pouco se conhece sobre a situação epidemiológica da tuberculose bovina (GRISI FILHO et al., 2011), pois não há publicações oficiais atualizadas de inquéritos epidemiológicos sobre a ocorrência e distribuição desta doença no âmbito nacional (FIGUEIREDO; ROCHA et al., 2010). Um estudo realizado em Minas Gerais, em 1999, em sete regiões do sul do Estado envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais estimou uma prevalência de 0,85% de animais infectados e 5% das propriedades foram consideradas focos da doença (BRASIL, 2006). Na Paraíba, dados da Agência de Defesa Agropecuária do Estado foram coletados durante o período de janeiro de 2008 a julho de 2009 no qual foram examinadas 10.963 propriedades e 54.472 bovinos. Como resultado obteve-se uma frequência de focos da tuberculose bovina de 62 (0,57%) e a frequência de animais infectados foi de 136 (0,25%), sendo considerado um percentual baixo a nível nacional (FIGUEIREDO; ROCHA et al., 2010). Em São Paulo, a partir de exames de carcaças em matadouros-frigoríficos, de 587 amostras processadas, 253 foram positivas para *M. bovis* e de 239 propriedades estudadas, 110 foram classificadas como foco bacteriológico da tuberculose bovina (GRISI FILHO et al., 2011). Um estudo de prevalência da tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso com uma população de 43.000 animais em 80 municípios, estimou-se que 0,007% dos animais e 0,61% do rebanho estavam infectados com esta enfermidade (FURLANETTO et al., 2012).

Os dados descritos acima demonstram que a tuberculose bovina é um problema

mundial e faz-se necessária a realização de estudos mais elaborados para se obter dados atuais e consistentes sobre esta enfermidade. Com estas informações seria possível escolher melhores estratégias de controle da doença tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento.

2.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

O desenvolvimento das alterações patológicas na tuberculose bovina está relacionado principalmente à via de infecção (BIET et al., 2005) e ao início da resposta imune celular (POLLOCK; NEILL, 2002). O principal órgão acometido é o pulmão, pois a principal via de transmissão é a inalação de aerossóis infecciosos (GRISI FILHO et al., 2011).

O bacilo *M. bovis* pode afetar vários tecidos, no entanto, as lesões macroscópicas são mais frequentemente encontradas nos linfonodos da cabeça, pescoço, mediastínicos, mesentéricos, além de pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio (CASSIDY et al., 1999; PALMER; WATERS; WHIPPLE, 2002).

Após infecção, os bacilos são fagocitados por macrófagos do organismo hospedeiro. Se não forem eliminados, os bacilos se multiplicam no interior destas células até destruí-las. Os bacilos liberados após destruição dos macrófagos são fagocitados por novos macrófagos ou por monócitos vindos da corrente circulatória. Por volta de duas a três semanas após a inalação ou ingestão do agente infeccioso sua multiplicação pode ser contida pelo estabelecimento da resposta imune celular e uma reação de hipersensibilidade tardia. Esse processo envolve a mediação por linfócitos T, com migração de novas células de defesa ao local da infecção que levarão à formação dos granulomas da tuberculose (KAUFMANN, 1990; POLLOCK; NEILL, 2002). A lesão primária associada à lesão no linfonodo regional é denominado “complexo primário” (NEILL et al., 1994; PALMER; WATERS, 2006).

Os granulomas podem evoluir transformando-se em uma cicatriz, ou sofrer necrose de caseificação que é identificada como uma massa amorfa eosinofílica com muitos restos celulares, envolvidos por células epitelióides, linfócitos, macrófagos e uma camada de fibroblastos na superfície (CASSIDY et al., 1999; NEILL et al., 1994; PALMER; WATERS; WHIPPLE, 2002). Macroscopicamente observa-se que as lesões possuem geralmente uma coloração amarelada, em forma de nódulos de um a três centímetros de diâmetro ou mais, que

podem ser confluentes, de aspecto purulento ou caseoso e com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar calcificação no centro da lesão nos casos mais avançados da enfermidade (CASSIDY et al., 1999; PALMER; WATERS; WHIPPLE, 2002; POLLOCK; NEILL, 2002; THOEN; LOBUE; DONALD, 2009).

A disseminação para outros órgãos pode ocorrer em função de uma queda na imunidade do animal. A tuberculose bovina pode se apresentar sob a forma miliar, quando acontece de forma abrupta e maciça, com disseminação de bacilos pela circulação sanguínea (MARQUES; MAIA JUNIOR; ZAPPA, 2008).

Os sintomas da tuberculose bovina são inespecíficos e os animais infectados podem permanecer assintomáticos até o estágio terminal da doença, porém estes animais conseguem eliminar o bacilo no ambiente contaminando animais sadios (GRISI FILHO et al., 2011). Na maioria dos casos, sinais clínicos só são percebidos em animais de idade mais avançada (IZAEL et al., 2009; PACHECO et al., 2009).

Os sintomas dependem dos órgãos acometidos (ABRAHÃO, 1999), mas em geral os bovinos infectados apresentam perda de peso crônica, apetite variável e febres flutuantes, que podem ser acentuadas após o parto; os sintomas respiratórios, embora mais comuns, tendem a ser mais brandos e compreendem tosse crônica suave e úmida, dispnéia, taquipnéia e hiperpnéia; linfonodos mediastínicos quando aumentados de volume podem causar obstruções intestinais, ulcerações e diarreias; o envolvimento de linfonodos retrofaríngeos pode causar dificuldades na deglutição e salivagem e também podem ser encontradas lesões em outros linfonodos periféricos, glândula mamária e mais raramente no trato reprodutivo causando infertilidade, abortamento, metrite e vaginite (IZAEL et al., 2009; LANGENEGGER; LANGENEGGER; OLIVEIRA, 1981; SMITH, 1993). Queda acentuada na produção de leite é normalmente relatada no caso de vacas enfermas (IZAEL et al., 2009; PACHECO et al., 2009).

2.5 IMUNIDADE

A resposta imune contra *M. bovis* é iniciada com a resposta imune inata do animal seguida pela resposta imune adquirida. Na resposta imune adquirida ocorre primeiro uma resposta imune celular e à medida que a doença progride, se desenvolve uma intensa resposta

imune humoral (WELSH et al., 2005).

Em uma infecção por via respiratória, quando os bacilos conseguem ultrapassar as barreiras físicas do trato respiratório, ocorre a fagocitose destes pelos macrófagos alveolares e células dendríticas (RAJA, 2004; POLLOCK et al., 2006), nos quais a eliminação do bacilo vai depender da interação entre a capacidade microbicida dos fagócitos e dos fatores de virulência dos bacilos (FLYNN; CHAN, 2001). Os macrófagos possuem mecanismos antimicrobianos que podem eliminar as micobactérias, uma vez que estejam ativados. Já as células dendríticas participam da resposta imune principalmente por meio da apresentação de antígenos aos linfócitos, haja vista, apresentam antígenos aos linfócitos conjugados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) juntamente com moléculas co-estimuladoras CD40 e CD80 (HOPE; VILLARREAL-RAMOS, 2008). A interação entre estes fagócitos e o bacilo é essencial para determinar o resultado da exposição que pode ser infecção, eliminação do patógeno ou latência (KAUFMANN, 2001; POLLOCK et al., 2006; WELSH et al., 2005).

Além da fagocitose e apresentação de antígeno, os macrófagos e células dendríticas participam da resposta imune contra *M. bovis* secretando citocinas e quimiocinas juntamente com outras células como os neutrófilos e células *Natural Killer* (NK) (WELSH et al., 2005; TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007). As células NK, inclusive, representam a primeira fonte de IFN- γ , IL-17 e IL-22 que desempenham um papel importante na resposta inflamatória a patógenos intracelulares (WATERS; PALMER et al., 2011).

As micobactérias patogênicas, como *M. bovis*, são capazes de inibir a maturação do fagossomo inibindo sua fusão com os lisossomos (HOPE; VILLARREAL-RAMOS, 2008). Esse evento inibe ou retarda a apresentação de antígenos suprimindo os eventos posteriores da resposta imune (RAJA, 2004), permitindo que elas sobrevivam e se multipliquem dentro dos fagócitos (POLLOCK; NEILL, 2002). Alguns mecanismos como a retenção da molécula TACO (*tryptophane-aspartate-containing coat protein*) (HOPE; VILLARREAL-RAMOS, 2008), e a competição bacilo/hospedeiro por íons ferro, são apontados como possíveis responsáveis pelo retardo na interação lisossomo/fagolisossomo (KAUFMANN, 2001).

Apesar dos mecanismos de escape das micobactérias frente ao sistema imunológico do hospedeiro, alguns fagócitos conseguem processar e apresentar antígenos do bacilo aos linfócitos T auxiliares, conjugados a moléculas de MHC II dando início a resposta imune

adquirida (POLLOCK; NEILL, 2002; TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007).

A resposta imune celular é a principal resposta imune adquirida a combater a infecção por *M. bovis* e os subtipos de células T ($\gamma\delta$, CD4 e CD8) estão envolvidos nesse processo (POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005). Além disso, linfócitos T CD4+ contribuem marcadamente para resposta imune contra *M. bovis* por meio da produção de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-12 e IFN- γ que são essenciais na ativação das vias microbicidas dos macrófagos para eliminação do patógeno (WELSH et al., 2005; HOPE; VILLARREAL-RAMOS, 2008).

A modulação da resposta imune celular em Th1, caracterizada principalmente por INF- γ e IL-12, ou Th2 caracterizada por IL-4 e IL-10, tem grande influência sobre o curso da infecção por *M. bovis* em bovinos (KAUFMANN, 2001). De acordo com Welsh et al. (2005) a resposta imune celular Th1 está baseada em uma maior capacidade de conter a infecção micobacteriana, enquanto que a resposta imune Th2 está associada com a progressão e patogenia da tuberculose bovina. Entretanto, os mecanismos exatos que favorecem o estabelecimento de um ou outro perfil imunológico ainda não são conhecidos (Figura).

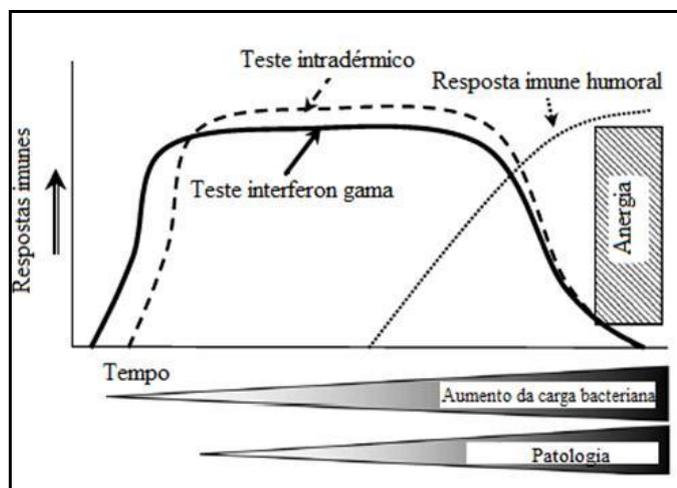


Figura: Representação do espectro de respostas imunes em bovinos que ocorrem após a infecção com *Mycobacterium bovis*. Adaptado de: DE LA RUA-DOMENECH et al. (2006).

A resposta imune humoral por parte dos linfócitos B, também é auxiliada pelas citocinas produzidas pelos linfócitos T. No entanto, devido a natureza intracelular dos agentes infecciosos, essa resposta torna-se pouco eficiente no combate a tuberculose (NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001), podendo inclusive contribuir para a patogênese da

enfermidade pela formação de imuno complexos que ativam o sistema complemento e como consequência podem causar lesão tecidual ou inibir o acesso de macrófagos ao sítio inflamatório (NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001; POLLOCK; NEILL, 2002). Atualmente a resposta imune humoral na tuberculose tem sido explorada no diagnóstico sorológico da enfermidade (AMADORI et al., 2002; LIU et al., 2007; WHELAN et al., 2011).

Os mecanismos da tuberculose associados à anergia não são totalmente compreendidos. Clinicamente, a anergia descreve a falta de reações de hipersensibilidade tardia cutânea dependente de linfócitos T contra antígenos específicos num estágio terminal da doença, mesmo se observando altos níveis de anticorpos circulantes (POLLOCK; NEILL, 2002). Acredita-se que o estabelecimento desse estado imunológico pode estar associado aos efeitos supressivos que os monócitos possam exercer sobre os linfócitos T, possivelmente mediados por TGF- β (Fator de crescimento transformador β) e que células T antígeno-específicas podem induzir anergia através da produção de IL-10 na ausência de INF- γ (NEILL; BRYSON; POLLOCK, 2001; POLLOCK; NEILL, 2002; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose em bovinos pode ser realizado de forma direta ou indireta. Os diretos estão relacionados na detecção e identificação do agente etiológico no material biológico e os indiretos pesquisam resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral (produção de anticorpos circulantes) ou celular (mediada por linfócitos e macrófagos) (MEDEIROS et al., 2010).

2.6.1 Métodos Diretos para Detecção de *Mycobacterium bovis*

Os exames microscópicos de esfregaços empregados para o diagnóstico da tuberculose bovina usando a coloração clássica de Ziehl-Neelsen são rápidos e baratos, contudo, exigem grandes concentrações de bactérias, cerca de 10^4 bacilos por mL ou mais (WARDS; COLLINS; DE LISLE, 1995; ZANINI et al., 2001) e ainda há dificuldades na obtenção das amostras (MEDEIROS et al., 2010).

O diagnóstico bacteriológico por isolamento é considerado como padrão ouro para

detecção de *M. bovis* (FIGUEIREDO; ROCHA et al., 2010) em amostras clínicas como tecidos, leite, muco nasal e sangue (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Para permitir o isolamento de qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium* sp. recomenda-se a semeadura concomitante nos meios de cultura Löwenstein-Jensen, que contém glicerol como fonte de energia, e Stonebrink-Lesslie, que contém piruvato como fonte de energia e é mais adequado para o isolamento de *Mycobacterium bovis*, pois essa espécie tem dificuldade de metabolizar o glicerol (RIVERA; JIMÉNEZ; DEWARD, 2009). O gênero *Mycobacterium* é muito exigente em relação à sua necessidade de nutrientes, enquanto que outros microrganismos se multiplicam mais rápido e mais facilmente do que *Mycobacterium* (MEDEIROS et al., 2010). Portanto, uma das limitações encontradas neste método é que a bactéria requer um longo período de incubação podendo levar mais de oito semanas para o seu crescimento (ANDERSEN et al., 2000). Outra limitação deste teste é devido aos efeitos tóxicos da descontaminação da amostra que pode causar inviabilidade da mesma e, assim, interferir na cultura celular (HOLANDA et al., 2002).

As provas bioquímicas que são realizadas após o cultivo bacteriano requer culturas puras e frescas para sua execução (CORNER, 1994), contudo, pode não ser possível realizar estes testes devido a contaminação das amostras ou ainda pelas dificuldades inerentes ao isolamento da bactéria (FRÁGUAS et al., 2008). Como também, os testes bioquímicos são trabalhosos e demandam muito tempo (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010).

O diagnóstico molecular está normalmente associado ao melhoramento na sensibilidade, especificidade e na redução do tempo para obtenção do resultado em relação aos métodos convencionalmente utilizados (COSTA, 2009).

A extração do DNA pode ser realizada a partir de sangue, tecidos, fluido cérebro-espinhal, muco nasal, leite, sêmen (NIYAZ AHMED; KHAN; GANAI, 1999), fezes, tecidos fixados em formol ou em blocos de parafina (HOSEK et al., 2006).

A obtenção do DNA apresenta algumas limitações devido a complexidade da parede celular micobacteriana, que torna os bacilos resistentes aos tampões de lise. Desta forma, pode diminuir a concentração do material genético e/ou comprometer sua qualidade (KÄSER et al., 2009).

A PCR é considerada um dos métodos diretos mais promissores para o diagnóstico da

tuberculose bovina (FIGUEIREDO; CARVALHO et al., 2010). Um estudo realizado por Figueiredo, Carvalho et al. (2010) utilizou amostras de DNA extraídos de esfregaços nasais colhidos de 34 vacas positivas no Teste Cervical Comparativo no qual foram submetidos a PCR multiplex. Dessas amostras somente 2 foram positivas para *M. bovis*. Isto pode ser consequência de poucas bactérias viáveis presentes nos esfregaços e pela dificuldade na obtenção de lavados bronco-alveolares em bovinos (FRÁGUAS et al., 2008) pois bovinos experimentalmente infectados com *M. bovis* tem um período de latência no qual o agente infeccioso não pode ser isolado a partir de lavados bronco-alveolares (FIGUEIREDO et al., 2012).

A detecção de *M. bovis* pela PCR utilizando leite de vacas com tuberculose pode ser utilizado para auxiliar no diagnóstico *in vivo* para essa enfermidade complementando os testes sorológicos ou bacteriológicos (FIGUEIREDO et al., 2012)

A PCR também tem sido usada com o objetivo de diferenciar *M. bovis* e *M. tuberculosis* (ARAÚJO et al., 2005). A PCR em tempo real (qPCR) é baseada na detecção da amplificação de segmentos de DNA específicos do patógeno por meio de emissão de sinais fluorescentes que serão utilizados na interpretação dos resultados de cada amostra (DORAK, 2006).

Apesar das vantagens no uso da PCR, existem algumas restrições na sua utilização para diagnóstico da tuberculose, como por exemplo, a complexidade desta técnica, o custo, de infraestrutura; além de técnicos especializados para o manuseio dos equipamentos e interpretação dos resultados (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010; VITALE et al., 1998). Além desses problemas uma amostra pode ter inibidores da PCR que pode levar a resultados falsos negativos (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010).

A técnica de PCR, assim como outras metodologias moleculares, não substituem os métodos clássicos de isolamento e identificação do agente, mas tem como objetivo auxiliar as metodologias existentes (FIGUEIREDO; CARVALHO et al., 2010; RUGGIERO et al., 2007).

Dessa forma, o diagnóstico *in vivo* tende a ser realizado a partir de métodos indiretos, como os testes imunológicos que são baseados na resposta celular (o teste intradérmico), *in vitro* (teste de Interferon- γ) e os testes baseados na resposta humoral (ELISA), como método de triagem em rebanhos (LILENBAUM, 2000).

2.6.2 Métodos Indiretos para Detecção de *Mycobacterium bovis*

2.6.2.1 Testes intradérmicos

O teste de diagnóstico primário para o controle e vigilância da tuberculose tanto em humanos quanto em bovinos é o teste intradérmico que tem sido utilizado há mais de cem anos (MONAGHAN et al., 1994; WHELAN et al., 2010).

Esse método fornece uma medida da resposta celular por meio de reações de hipersensibilidade tardia, devido à inoculação de tuberculinas, um extrato bruto que é obtido a partir de cultura de micobactéria. As tuberculinas disponíveis para o diagnóstico indireto, *in vivo* da tuberculose bovina são: o PPD bovino, que corresponde ao extrato antigênico de proteínas purificadas derivadas da amostra AN5 de *M. bovis*, e o PPD aviário, sintetizado a partir da amostra D4 de *M. avium* (GOOD; DUIGNAN, 2011; MONAGHAN et al., 1994).

O teste alérgico da tuberculinização deve ser realizado em animais com idade igual ou superior a seis semanas (BRASIL, 2006) e precisa-se obedecer a um intervalo de 42 a 60 dias para repetição do teste, no intuito de evitar a ocorrência de resultado falso negativo (ROXO, 1997).

Após a tuberculinização os animais ficam dessensibilizados, ou seja, há uma diminuição na capacidade de responder a novos testes (MONAGHAN et al., 1994). O teste intradérmico também não deve ser realizado no intervalo de 15 dias antes ou após o parto, pois as fêmeas podem apresentar-se menos reativas neste período (BRASIL, 2006). Acredita-se que isso pode ser decorrente de uma reduzida atividade imunológica que está relacionada a descarga hormonal induzida pelo parto (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Os testes tuberculínicos podem ser simples ou comparativos. Os testes tuberculínicos simples utilizam apenas a tuberculina bovina (teste da prega caudal - TPC ou o teste cervical simples - TCS). O teste comparativo (teste cervical comparativo - TCC) faz uso das tuberculinas bovina e aviária simultaneamente e, em geral, é utilizado como teste confirmatório (MONAGHAN et al., 1994; SCHILLER et al., 2010).

A interpretação do TPC e do TCS está baseada no seguinte princípio: Quando a tuberculina bovina é injetada na dobra da pele do bovino que não foi sensibilizado por

antígenos micobacterianos não haverá uma resposta inflamatória local. Contudo, se a tuberculina for injetada em um animal no qual o sistema imune foi sensibilizado por uma infecção por *M. bovis* ou por outras micobactérias, isso ocasionará uma resposta inflamatória que produzirá o entumescimento no local da injeção que atinge uma maior intensidade 48-72 horas após a injeção da tuberculina (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

A interpretação do TCC está baseada no fato de que os animais infectados com *M. bovis* tendem a apresentar uma maior resposta à tuberculina bovina do que à aviária (ambas aplicadas na dobra da pele do pescoço) enquanto que infecções com outras micobactérias promovem a relação inversa (POLLOCK; WELSH; MCNAIR, 2005). Por essas razões, o TCC permite uma melhor diferenciação entre os animais infectados com *M. bovis* e aqueles expostos a organismos do complexo *M. avium-intracellulare* ou micobactérias ambientais não patogênicas (SMITH, 1993).

Os testes de tuberculinização podem ocasionar resultados falso-negativos. O fenômeno da anergia, que é caracterizado pela falta de reatividade ao teste cutâneo, é responsável por algumas situações, principalmente quando se têm infecções avançadas por *M. bovis* (GORMLEY et al., 2006), final da gestação ou pós-parto, desnutrição e uso inadequado de drogas imunossupressoras. Além disso, variações inerentes ao teste, tais como dose, conservação e a própria tuberculina utilizada, somadas às possíveis variações na execução, leitura e interpretação do teste, podem contribuir para o aumento de resultados falso-negativos (MONAGHAN et al., 1994).

Animais que são reagentes ao teste tuberculínico e que não apresentam lesões macroscópicas podem estar relacionado com: estágios iniciais de infecção com *M. bovis*, pois esses animais podem apresentar granulomas muito pequenos ou pouco frequentes para serem visualizados nos exames *post-mortem*; animais infectados com *M. bovis*, mas sem doença, ou seja, temporariamente capazes de conter o bacilo em uma condição de latência; ou ainda animais não infectados, expostos aos antígenos de micobactérias ambientais que apresentam reações cruzadas no teste (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Apesar do TCC apresentar sensibilidades entre 74,4% e 88,4%; e especificidades entre 97,3% e 98,6% (FARNHAM et al., 2011), este teste é bastante laborioso, já que necessita a contenção dos bovinos para tricotomia, inoculação intradérmica das tuberculinas e leitura da espessura cutânea. Além disso, após 72 horas, é necessária nova contenção para leitura dos

resultados. Isto limita a execução do teste em rebanhos numerosos.

A utilização de antígenos específicos do complexo MTB, tais como CFP-10 e ESAT-6 em testes intradérmicos resulta em um aumento da especificidade e sensibilidade do teste (BUDDLE; LIVINGSTONE; DE LISLE, 2009; WHELAN et al., 2010). Outros antígenos que também estão sendo estudados em teste de intradermorreação em bovinos são MPB70, MPB83, Rv3615c sendo testados isoladamente ou como coquetéis para diferenciação de animais infectados de não infectados no teste cutâneo proporcionando um diagnóstico sensível para diferenciar bovinos infectados de vacinados (WHELAN et al., 2010).

As limitações que este teste possui, levou aos grupos de pesquisa em tuberculose bovina a pesquisarem novas estratégias para o diagnóstico desta enfermidade (LILENBAUM, 2000), pois nem todos os animais infectados respondem positivamente à tuberculina (GOOD; DUGNAN, 2011). Outros testes para o diagnóstico desta doença são: o teste de IFN- γ , que já é considerado uma estratégia promissora (AAGAARD et al., 2010), e é oficializado para uso em gado bovino na Austrália e Nova Zelândia (LILENBAUM, 2000), como também testes baseados em anticorpos.

2.6.2.2 Teste de Interferon-gama (IFN- γ)

O teste do IFN- γ permite detectar uma resposta imune celular de linfócitos T CD4+ baseado na produção de IFN- γ *in vitro* (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010; POLLOCK et al., 2006), cerca de 14 dias após a infecção, antes mesmo do início da resposta à tuberculinização (POLLOCK et al., 2006).

O Bovigam® é um teste comercial para a dosagem de IFN- γ bovino que tem sido usado em diversos países. No Brasil o teste de IFN- γ já foi utilizado em condições de campo em animais de rebanhos sob risco de tuberculose e apresentou sensibilidade de 100%, superior à tuberculinização cervical simples com sensibilidade de 88,3% (LILENBAUM; SCHETTINI et al., 1999).

A utilização desse teste associado com a tuberculinização poderia ajudar na detecção precoce de outros animais infectados. Em estudo realizado por Gormley et al. (2006) demonstraram que em um grupo de 197 bovinos infectados considerados negativos ou inconclusivos no TCC, 145 (74%) foram positivos no teste do IFN- γ . Isso pode ter ocorrido

pelo fato de alguns destes animais terem alcançado estágios avançados da doença e se tornado anérgicos. Daí a importância da combinação de testes, pois estes animais não seriam classificados como reagentes no primeiro teste e se deixados nos rebanhos seriam fonte de infecção para outros animais.

Esse ensaio apresenta vantagens como: é um procedimento que pode ser realizado várias vezes e sem intervalo de tempo em relação ao teste tuberculínico (RUGGIERO et al., 2007), a interpretação dos resultados é dada em valores numéricos tornando-se mais objetiva e padronizada, permite a diferenciação de respostas associadas com micobactérias patogênicas daquelas resultantes da exposição à micobactérias ambientais (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006) e para sua realização o animal precisa ser contido apenas uma vez (MEDEIROS et al., 2010).

Contrariamente, seu emprego ainda oferece algumas restrições, como o elevado custo, pois é uma tecnologia importada e requer equipamentos de laboratório sofisticados, a necessidade de um curto espaço de tempo para o processamento das amostras de sangue (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006) e o uso desse teste pode sofrer interferência de corticoides devido a redução nos níveis séricos de IFN- γ (GORMLEY et al., 2006).

2.6.2.3 Teste de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) e antígenos promissores para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*

Existem várias vantagens em utilizar os métodos sorológicos, como por exemplo, estes testes requerem apenas uma visita do veterinário para a fazenda; a coleta do sangue pode ser feita quantas vezes for necessária sem alterar o estado imunológico do animal (MEDEIROS et al., 2010); os anticorpos presentes no soro são mais estáveis durante o transporte, o manuseio e armazenamento da amostra (GREEN et al., 2009). O ensaio ELISA permite o processamento de grande número de amostras em curto espaço de tempo e a leitura dos resultados é automatizada (SOARES, 2001) o que diminui a probabilidade de erros.

Animais infectados por *M. bovis* desenvolvem primariamente uma resposta imune celular (POLLOCK et al., 2006), e a medida que a doença progride há um aumento da resposta humoral, pois nesta fase os títulos de anticorpos é maior que na fase inicial da doença (WELSH et al., 2005).

As primeiras padronizações de ELISA para diagnóstico da tuberculose bovina foram realizadas utilizando-se antígenos não purificados que apresentavam sensibilidade e especificidade baixas (AUER, 1987).

Desta maneira, muitos estudos nesta área estão concentrados na identificação dos antígenos relacionados à resposta humoral em animais infectados com *M. bovis* e de acordo com Medeiros et al. (2010), os resultados obtidos são promissores para a utilização da sorologia como teste complementar no diagnóstico da tuberculose bovina.

Um teste sorológico utilizando PPD bovino como antígeno, apresentou 90% de sensibilidade e 89,8% de especificidade, valores muito próximos aos encontrados em testes intradérmicos (RITACCO et al., 1987).

Resultados apresentados por Lilenbaum, Ribeiro et al. (1999) comparando um teste sorológico tipo ELISA com a tuberculinização intradérmica para detecção de animais infectados com *M. bovis* no Rio de Janeiro, Brasil, sugerem uma boa concordância entre os dois testes, uma vez que a sensibilidade e especificidade do primeiro teste foram de 86,7% e 90,6%, respectivamente e do segundo teste de 87,7% e 95,2%, respectivamente.

A proteína MPB70 é uma das principais proteínas secretadas de *M. bovis* (WIKER, 2009) sendo considerada muito importante para desencadear resposta imune humoral e celular (LIU et al., 2007). Ela representa mais de 10% das proteínas que são secretadas no meio de cultura de *M. bovis* (NAGAI; MATSUMOTO; NAGASUGA, 1981). A expressão de MPB70 foi dividida em dois grupos: aquelas que possuem altas concentrações que são a BCG Tóquio, Moreau, Rússia, Suécia e Romênia, e as que possuem baixas concentrações como BCG Pasteur, Dinamarquês 1331, Glaxo, Tice e Pequim. Esta subdivisão foi atribuída pelo Instituto de Pasteur no ano de 1920 (WIKER, 2009).

Um estudo realizado por Harboe e Nagai (1984) demonstrou que em coelhos imunizados com BCG, a produção de anticorpos contra MPB70 foi mais rápida se comparado com outros componentes de BCG. Inicialmente, MPB70 foi utilizada como antígeno para diagnóstico sorológico pela técnica de ELISA com proteína G biotilada, em bovinos infectados experimentalmente com *M. bovis*. Não houve reações cruzadas com soros de animais infectados com *M. avium*, *M. paratuberculosis*, e *Corynebacterium pseudotuberculosis* (HARBOE et al., 1990). Outro exemplo do potencial da proteína MPB70 pode ser observado em um ELISA realizado com soros de 33 bovinos TCC positivos e 43

TCC negativos, no qual a sensibilidade e especificidade do teste foram de 81,8% e 100%, respectivamente (JEON et al., 2010).

MPB83 é uma lipoproteína (LIU et al., 2007), que foi isolada inicialmente de um fluído de cultura de *M. bovis* BCG Tóquio. Essa proteína possui massa molecular semelhante à de MPB70 (22 kDa), porém com ponto isoelétrico diferente. Anticorpos gerados contra as duas proteínas têm especificidades distintas, porém ocorrem reações cruzadas entre ambas (HARBOE et al., 1995). Além disto, é uma proteína antigênica capaz de desencadear resposta imune humoral (MCNAIR et al., 2001), demonstrando sua viabilidade para utilização em testes de diagnóstico para detecção de bovinos infectados com *M. bovis* (GREEN et al., 2009). A proteína MPB83 já foi usada em um *kit* comercial denominado SeraLyte-MBV™ (Prisest) *system* baseado em um teste de imunofluorescência para detecção rápida de bovinos com tuberculose bovina no qual apresentou uma especificidade de 98% sendo considerada promissora para o diagnóstico desta enfermidade (GREEN et al., 2009).

As proteínas MPB70 e MPB83 também já foram utilizadas em um teste sorológico para distinguir um grupo de bovinos com tuberculose bovina e outro com paratuberculose e os resultados obtidos permitiram concluir que estas proteínas podem ser capazes de diferenciar estas enfermidades (MARASSI et al., 2010).

Um teste ELISA comercial para anticorpos contra *M. bovis* usando os antígenos recombinantes MPB70 e MPB83 forneceu uma sensibilidade de 63% e especificidade de 98% em bovinos naturalmente infectados demonstrando o potencial destes antígenos em testes sorológicos (WATERS; BUDDLE et al., 2011).

Outras proteínas que estão sendo pesquisadas são ESAT-6 (HARBOE et al., 1996) e CFP-10, pois elas estão presentes em *M. tuberculosis* e em *M. bovis* virulento e ausente no *M. bovis* BCG e nas micobactérias ambientais (WATERS et al., 2006). ESAT-6 é considerada bastante imunogênica com capacidade de gerar resposta imune celular e humoral (LIU et al., 2007). Com a utilização de ESAT-6 em um teste sorológico, foi possível detectar sensibilidade de 98,6% e especificidade de 98,5% (KOO et al., 2005).

O desenvolvimento de um teste sorológico utilizando uma combinação de proteínas pode ser uma estratégia para melhorar o desempenho do teste e obtenção de resultados mais satisfatórios (LIU et al., 2007), pois os antígenos são capazes de induzir respostas em diferentes fases da infecção (MEIKLE et al., 2009).

Na fase inicial da infecção, as principais proteínas detectadas são ESAT-6, CFP-10 (KOO et al., 2004) e são capazes de detectar precocemente o antígeno. Já nos estágios mais avançados da doença, são detectadas outras proteínas como, por exemplo, MPB70 (KOO et al., 2005).

De acordo com a literatura, em um estudo realizado por Liu et al. (2007), um ELISA indireto foi estabelecido usando proteínas fusionadas MPB70, MPB83 e ESAT-6 resultando em uma sensibilidade de 69,4% e especificidade de 96% que, comparando com os testes intradérmicos são consideradas altas. Dessa forma, o ensaio ELISA pode ser um teste complementar aos testes de intradermoreação.

Alguns animais não são detectados no TCC, permanecendo como fonte de infecção no rebanho. Em um ensaio ELISA utilizando os antígenos ESAT-6, MPB70, MPB83, CFP-10, α -crystallin-2 e Rv3616c foram testados 60 soros de animais nos quais 34 eram inconclusivos e 26 eram negativos no TCC. Os resultados obtidos neste estudo reforçam a ideia da utilização do ELISA como teste auxiliar ao TCC, pois dos 60 animais, 53 (88,3%) foram positivos no teste sorológico (WHELAN et al., 2011).

As proteínas da família PPE estão envolvidas no processo de virulência, manutenção do crescimento bacteriano dentro dos macrófagos e na regulação da necessidade de íons ferro pela célula bacteriana (LE MOIGNE et al., 2005), porém pouco se sabe sobre a sua função ou imunogenicidade. PE5 e PE13 são encontradas em todas as cepas vacinais BCG (AAGAARD et al., 2006).

Atualmente, existem estudos sobre os antígenos específicos do complexo *M. tuberculosis* preferencialmente reconhecidos pela resposta humoral em bovinos infectados por *M. bovis*, tais como MPB70, MPB63, MPB83 e ESAT-6 (AMADORI et al., 2002; HARBOE et al., 1990; LE MOIGNE et al., 2005; LYASHCHENKO et al., 1998), dentre outras proteínas promissoras como HSPX, Esx-I e Rv0138 que podem ser usadas em testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose bovina (MEIKLE et al., 2009).

Assim, acredita-se que as proteínas recombinantes específicas produzidas por engenharia genética para serem usadas no teste complementar para o diagnóstico da tuberculose bovina em ensaios individuais ou, posteriormente, na forma de moléculas fusionadas poderá contribuir para o sucesso do PNCEBT e para a redução das perdas econômicas relativas a essa enfermidade.

2.7 MEDIDAS DE CONTROLE

Devido à importância da tuberculose bovina no cenário do agronegócio brasileiro, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprovou, por meio da Instrução Normativa n. 6, de 8 de janeiro de 2004, o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) em 2006 publicou o Manual Técnico (BRASIL, 2004, 2006).

No Brasil o PNCEBT prevê a certificação de estabelecimento de criação livre de tuberculose. Para isso o programa determina que os animais reagentes positivos ao teste da tuberculinização deverão ser isolados da produção leiteira e de todo o rebanho, sendo sacrificados no prazo máximo de 30 dias após o diagnóstico em estabelecimento sob serviço de inspeção oficial indicado pelo serviço de defesa oficial federal ou estadual. Para o saneamento das propriedades que entram em processo de certificação, os testes deverão ser realizados em todo o rebanho até a obtenção de três resultados sem um único animal reagente positivo ao longo de um período mínimo de nove meses. Uma vez terminado o saneamento, a propriedade obtém o certificado de livre dessas doenças, cuja manutenção depende do cumprimento de todas as regras e normas sanitárias estabelecidas. As propriedades certificadas ficam obrigadas a repetir os testes anualmente (BRASIL, 2006).

Na certificação de estabelecimentos de criação monitorados para tuberculose é restrita a criação especializada em pecuária de corte. Nesse caso os animais são escolhidos por amostragem. Não sendo detectados animais reagentes positivos na tuberculinização, a propriedade receberá o certificado de monitorada para a tuberculose. Porém, se forem encontrados animais reagentes positivos, os animais não incluídos na amostragem inicial serão submetidos à tuberculinização e todos os animais reagentes positivos serão sacrificados. Somente após essa etapa a propriedade receberá o certificado de monitorada para a tuberculose (BRASIL, 2006).

Atualmente, existem estudos sobre a vacinação contra tuberculose bovina. Nas pesquisas realizadas em todo o mundo busca-se produzir um antígeno capaz de desenvolver imunidade e não interferir nos testes diagnósticos (POLLOCK et al., 2001), pois o uso de uma vacina para reduzir ou erradicar a doença tem sido considerada uma alternativa promissora para o controle da tuberculose em bovinos. Existem relatos da eficiência da vacina BCG contra o desafio experimental em gado, porém não há estudos recentes sobre a eficácia desta

vacina contra animais naturalmente infectados (BUDDLE et al., 2011).

Um dos grandes problemas a ser considerado com o uso de BCG em bovinos é que a vacinação pode deixar os animais sensibilizados comprometendo assim o diagnóstico da tuberculose nestes animais (BUDDLE et al., 2011).

Um estudo realizado por Whelan et al. (2010) para diferenciação de animais infectados de vacinados demonstrou que a sensibilização dos bovinos com a cepa vacinal (BCG) compromete a sensibilidade do teste quando é utilizado o PPD bovino para diagnóstico, enquanto que a combinação de antígenos ESAT-6, CFP-10, MPB70 e MPB83 proporcionou um diagnóstico prático e sensível para diferenciar os infectados de vacinados.

O tratamento de bovinos com tuberculose, principalmente com isoniazida, tem sido proibido em países que têm programas de controle, pois por meio de tratamento ainda não é possível eliminar todos os animais portadores do bacilo, e como consequência a fonte de infecção e a doença no rebanho é disseminada (ROXO, 1997).

Medidas gerais de higiene, como limpeza e desinfecção das instalações, cuidado na introdução de novos animais no rebanho (com testes negativos, provenientes de rebanhos livres, quarentenários e isolamento de animais suspeitos) são importantes para evitar que a doença se instale na propriedade (ROXO, 1996).

Deve-se abolir a utilização do leite de vacas reagentes para qualquer finalidade e em quaisquer circunstâncias (BRASIL, 2006), porque a ingestão do leite cru também é considerada via de transmissão da tuberculose para os humanos (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010). Contudo, para diminuir os riscos de transmissão de *M. bovis*, deve-se realizar a inspeção sanitária dos produtos de origem animal destinados ao consumo humano e a pasteurização do leite e derivados.

De acordo com Michel, Müller e Van Helden (2010), causas adicionais para a ocorrência de infecção em humanos em países em desenvolvimento são as práticas culturais e religiosas, bem como fatores socioeconômicos.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, C. 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*, Amsterdam, v. 96, n. 3-4, p. 161-169, 2010.
- AAGAARD, C. et al. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 44, n. 12, p. 4.326-4.335, 2006.
- ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.
- 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*, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.
- ALMEIDA, R. F. C. *Testes diagnósticos in vivo, in vitro e investigação epidemiológica da tuberculose bovina*. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2004.
- AMADORI, M. et al. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 85, n. 4, p. 379-389, 2002.
- ANDERSEN, P. et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, Londres, v. 356, n. 9.235, p. 1.099-1.104, 2000.
- ARAÚJO, C. P. et al. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 749-752, 2005.
- AUER, L. A. Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Australian Veterinary Journal*, Sydney, v. 64, n. 6, p. 172-176, 1987.
- BENTO, J. et al. Métodos diagnósticos em tuberculose. *Acta Médica Portuguesa*, Lisboa, v. 24, n. 1, p. 145-154, 2011.
- BIET, F. et al. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*, Paris, v. 36, n. 3, p. 411-436, 2005.
- BOUKARY, A. R. et al. Bovine tuberculosis prevalence survey on cattle in the rural livestock system of Torodi (Niger). *PloS One*, São Francisco, Ca, v. 6, n. 9, p. 1-10, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): manual técnico*. Brasília, DF: MAPA/SDA/DSA, 2006. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Sanitária. Instrução Normativa n. 6, de 8 de janeiro de 2004. Aprova o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, seção 1, p. 6-10, 12 jan. 2004.

BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. The envelope of micobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, CA, v. 64, p. 29-63. 1995.

BUDDLE, B. M. et al. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 151, n. 1-2, p. 14-22, 2011.

BUDDLE, B. M.; LIVINGSTONE, P. G.; DE LISLE, G. W. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, Wellington, v. 57, n. 4, p. 173-180, 2009.

CASSIDY, J. P. et al. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *Journal of Comparative Pathology*, Liverpool, v. 121, n. 4, p. 321-337, 1999.

CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; LEÃO, S. C. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, p. 745-748, 2004.

CORNER, L. A. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 53-63, 1994.

COSIVI, O. et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, GA, v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998.

COSTA, P. M. N. *Diagnóstico molecular da tuberculose bovina*. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina) – Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2009.

COUSINS, D. V. et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 53, n. 5, p. 1.305-1.314, 2003.

DE KANTOR, I. N. et al. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 88, n. 4, p. 358-365, 2008.

DE KANTOR, I. N.; RITACCO V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 112, n. 2-4, p. 111-118, 2006.

DE LA RUA-DOMENECH, R. et al. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v. 81, n. 2, p. 190-210, 2006.

DE LISLE, G. W. et al. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and

management. *Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics*, Paris, v. 21, n. 2, p. 317-334, 2002.

DORAK, M. T. *Real-time PCR*. 26th ed. Oxford: Taylor e Francis, 2006.

ESSEY, M. A.; KOLLER, M. A. Status of bovine tuberculosis in North America. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 15-22, 1994.

ETTER, E. et al. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Nova York, v. 1.081, p. 61-73, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, Parma, v. 7, n. 1, p. 1-312, 2009. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/223r.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

FARNHAM, M. W. et al. Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 103, n. 2-3, p. 234-242, 2011.

FIGUEIREDO, E. E. S.; CARVALHO, R. C. T. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculosis cattle by a multiplex PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, p. 386-390, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v41n2/v41n2a20.pdf>>. Acesso em 01 mar. 2012.

FIGUEIREDO, E. E. S. et al. Molecular techniques for identification of species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: the use of multiplex PCR and an adapted HPLC method for identification of *Mycobacterium bovis* and diagnosis of bovine tuberculosis. In: CARDONA, P. (Ed.). *Understanding Tuberculosis – Global experiences and innovative approaches to the diagnosis*. Croácia: In Tech, 2012. p. 411- 432.

FIGUEIREDO, S. M.; ROCHA, V. C. M. et al. Tuberculose bovina no Estado da Paraíba: estudo retrospectivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 30, p. 712-716, 2010.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 19, p. 93-129, 2001.

FRÁGUAS, S. A. et al. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Niterói, v. 15, n. 3, p. 117-121, 2008.

FURLANETTO, L. V. et al. Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 2012 (no prelo).

GARNIER, T. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, DC, v. 100, n. 13, p. 7.877-7.882, 2003.

GOOD, M.; DUGNAN, A. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Veterinary Medicine International*, Cairo, v. 2.011, p. 1-

11, 2011. Disponível em: <<http://downloads.hindawi.com/journals/vmi/2011/410470.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

GORMLEY, E. et al. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 112, n. 2-4, p. 171-179, 2006.

GREEN, L. R. et al. Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, Washington, DC, v. 16, n. 9, p. 1.309-1.313, 2009.

GRISI FILHO, J. H. H. et al. Análise epidemiológica das condenações de bovinos por tuberculose em abatedouros do estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 175-181, 2011.

GUTIÉRREZ, M.; TELLECHEA, J.; GARCÍA MARÍN, J. F. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 62, n. 4, p. 281-290, 1998.

HARBOE, M. et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity*, Washington, DC, v. 64, n. 1, p. 16-22, 1996.

HARBOE, M. et al. Homology between the MPB70 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oslo, v. 42, n. 1, p. 46-51, 1995.

HARBOE, M. et al. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 28, n. 5, p. 913-921, 1990.

HARBOE, M.; NAGAI, S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *The American Review of Respiratory Disease*, Baltimore, v. 129, n. 3, p. 444-452, 1984.

HOLANDA, E. D. et al. Avaliação de métodos de descontaminação para isolamento de *Mycobacterium bovis*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 24, p. 54-57, 2002.

HOPE, J. C.; VILLARREAL-RAMOS, B. Bovine TB and the development of new vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v. 31, n. 2-3, p. 77-100, 2008.

HOSEK, J. et al. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinární Medicina*, Praha, v. 51, n. 5, p. 180-192, 2006. Disponível em: <<http://vri.cz/docs/vetmed/51-5-180.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

IZAEL, M. A. et al. Estudo retrospectivo da ocorrência dos casos de tuberculose bovina diagnosticados na clínica de bovinos de Garanhuns-PE, de 2000 a 2009. *Ciência Animal Brasileira*, p. 452-457, 2009. Suplemento 1. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/7819/5625>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

JEON, B. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using milk samples as a potential screening test of bovine tuberculosis of dairy cows in Korea. *Research in Veterinary*

Science, Oxford, v. 88, n. 3, p. 390-393, 2010.

JORGE, K. S. G.; ALMEIDA, R. F. C. et al. Tuberculose bovina: epidemiologia e controle. In: MADRUGA, C. R. et al. (Eds.). *Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 45-59.

KARLSON, A. G.; LESSEL, E. F. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 20, n. 3, p. 273-282, 1970.

KÄSER, M. et al. Optimized method for preparation of DNA from pathogenic and environmental mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 75, n. 2, p. 414-418, 2009.

KAUFMANN, S. H. E. How can Immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews. Immunology*, London, v. 1, n. 1, p. 20-30, 2001.

_____. Immunity to mycobacteria. *Research in Microbiology*, Amsterdam, v. 141, n. 7-8, p. 765-768, 1990.

KOO, H. C. et al. New Latex bead agglutination assay for differential diagnosis of cattle infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Washington, DC, v. 11, n. 6, p. 1.070-1.074, 2004.

KOO, H. C. et al. Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the Enzyme-Linked Immunosorbent, Immunochromatographic, and Latex bead Agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 43, n. 9, p. 4.498-4.506, 2005.

LAGE, A. P. et al. *Atualização em tuberculose bovina*. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998.

LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C. H.; OLIVEIRA, J. Tratamento da tuberculose bovina com isoniazida. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 1-6, 1981. Disponível em: <http://www.pvb.com.br/pdf_artigos/06-05-2007_10-59Vet%20001.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2011.

LE MOIGNE, V. et al. Expression, immunochemical characterization and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein p27. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 85, n. 4, p. 213-219, 2005.

LIGHTBODY, K. A. et al. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 177-188, 2000.

LIGHTBODY, K. A. et al. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *The Veterinary Record*, London, v. 142, n. 12, p. 295-300, 1998.

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, p. 145-151. 2000.

LILENBAUM, W.; RIBEIRO, E. R.; et al. Evaluation of an ELISA-PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v. 66, n. 3, p. 191-195, 1999.

- LILENBAUM, W.; SCHETTINI, J. C. et al. Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, Berlin, v. 46, n. 5, p. 353-358, 1999.
- LIU, S. et al. A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 87, n. 3, p. 212-217, 2007.
- LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; THOEN, C. O. Tuberculosis in humans and animals: An overview. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Paris, v. 9, n. 14, p. 1.075-1.078, 2010.
- LYASHCHENKO, K. P. et al. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*, Washington, DC, v. 66, n. 11, p. 5.344-5.349, 1998.
- MARASSI, C. D. et al. The use of MPB70 and MPB83 to distinguish between bovine tuberculosis and paratuberculosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v. 33, n. 6, p. 485-489, 2010.
- MARQUES, M. E. O.; MAIA JUNIOR, J. F.; ZAPPA, V. Controle da tuberculose bovina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Garça, ano 6, n. 10, p. 1-5, 2008. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL21.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2011.
- MCNAIR, J. et al. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oslo, v. 53, n. 4, p. 365-371, 2001.
- MEDEIROS, L. S. et al. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis. *Brazilian Journal of Microbiology*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 7, p. 1-11, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v41n3/aop0210.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2011.
- MEIKLE, V. et al. Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. *Clinical and Vaccine Immunology*, Washington, DC, v. 16, n. 9, p. 1.352-1.359, 2009.
- MENZIES, F. D.; NEILL, S. D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, London, v. 160, n. 2, p. 92-106, 2000.
- MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 371-381, 2010.
- MIKKELSEN, H. et al. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 152, n. 1-2, p. 1-20, 2011.
- MODA, G. et al. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Disease*, Edinburgh, v. 77, n. 2, p. 103-108, 1996.

- MONAGHAN, M. L. et al. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 111-124, 1994.
- MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 153-177, 1994.
- MURAKAMI, P. S. et al. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-74, 2009.
- NAGAI, S.; MATSUMOTO, J.; NAGASUGA, T. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity*, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 1.152-1.160, 1981.
- NARANJO, V. et al. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 127, n. 12, p. 1-9, 2008.
- NEILL, S. D. et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 41-52, 1994.
- NEILL, S. D.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 81, n. 1-2, p. 79-86, 2001.
- NIEMANN, S. et al. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 38, n. 9, p. 3.231-3.234, 2000.
- NISHI, J. S.; SHURY, T.; ELKIN, B. T. Wildlife reservoirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: Strategies for management and research. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 112, n. 2-4, p. 325-338, 2006.
- NIYAZ AHMED, A. S.; KHAN, J. R.; GANAI, N. A. DNA amplification assay for rapid detection of bovine tubercle bacilli in semen. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 57, n. 1-2, p. 15-21, 1999.
- OLEA-POPELKA, F. J. et al. Risk factors for disclosure of additional tuberculous cattle in attested-clear herds that had one animal with a confirmed lesion of tuberculosis at slaughter during 2003 in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p. 81-91, 2008.
- OLIVEIRA, I. A. S. et al. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 395-400, 2007.
- PACHECO, A. M. et al. Tuberculose bovina: relato de caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Garça, ano 7, n. 13, p. 1-5, 2009. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria13/relatos/rc%2016.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2011.
- PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 112, n. 2-4, p. 181-190, 2006.
- PALMER, M. V.; WATERS, W. R.; WHIPPLE, D. L. Lesion development in White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*.

Veterinary Pathology, Basel, v. 39, n. 3, p. 334-340, 2002.

PINTO, P. S. A. et al. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 3, n. 1, p. 10-15, 2002.

POLLOCK, J. M. et al. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 81, n. 1-2, p. 103-107, 2001.

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

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*, London, v. 163, n. 2, p. 115-127, 2002.

POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D.; MCNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam v. 108, n. 1-2, p. 37-43, 2005.

RAJA, A. Immunology of tuberculosis. *The Indian Journal of Medical Research*, New Delhi, v. 120, n. 4, p. 213-232, 2004.

RICHARDS, O. W. The staining of acid-fast tubercle bacteria. *Science*, New York, v. 93, n. 2.408, p. 190, 1941.

RITACCO, V. et al. Assessment of the sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, Berlin, v. 34, n. 2, p. 119-125, 1987.

RIVERA, S. P.; JIMÉNEZ, J. F.; DEWARD, J. Valoración de las pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina en un rebaño bovino ubicado en zona de alta incidencia del Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, Venezuela, v. 19, n. 6, p. 566-575, 2009.

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 101-108, 1997.

_____. Tuberculose bovina: revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 91-97, 1996.

RUGGIERO, A. P. et al. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

SCHENK, M. A. M; SCHENK, J. A. P. Prevalência de tuberculose, cisticercose e hidatidose em bovinos abatidos nos matadouros frigoríficos do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974/1979). *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, v. 1, p. 28-31, 1982.

SCHILLER, I. et al. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 151, p. 153-159, 2011.

SCHILLER, I. et al. Bovine tuberculosis: Effect of the tuberculin skin test on *in vitro*

interferon gamma responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 136, n. 1-2, p. 1-11, 2010.

SMITH, B. P. *Tratado de Medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1993. v. 1.

SMITH, N. H. et al. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews. Microbiology*, London, v. 7, n. 7, p. 537-544, 2009.

SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. Técnicas imunoenzimáticas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. (Eds.). *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa-Gado de Corte, 2001. p. 145-178.

SPRINGER, B. et al. Lack of mismatch correction facilitates genome evolution in mycobacteria. *Molecular Microbiology*, Oxford, v. 53, n. 6, p. 1.601-1.609, 2004.

SURUJBALLI, O. P. et al. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 149-157, 2002.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Brasília, DF, v. 3, n. 33, p. 323-334, 2007.

THOEN, C. O.; KARLSON, A. G.; HIMES, E. M. Mycobacterial infections in animals. *Reviews of Infectious Diseases*, Chicago, v. 3, n. 5, p. 960-972, 1981.

THOEN, C. O.; LOBUE, P. A.; DONALD, A. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria Italiana*, Teramo, v. 45, n. 1, p. 135-181, 2009.

THOEN, C.; LOBUE, P.; DE KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 112, n. 2-4, p. 339-345, 2006.

THOREL, M.; KRICHEVSKY, M.; LEVY-FRÉBAULT, V. V. Numerical taxonomy of Mycobactin-dependent Mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, London, v. 40, n. 3, p. 254-260, 1990.

TURENNE, C. Y.; WALLACE, R. J.; BEHR, M. A. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, DC, v. 20, n. 2, p. 205-229, 2007.

VITALE, F. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 36, n. 4, p. 1.050-1.055, 1998.

WARDS, B. J.; COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 43, n. 2-3, p. 227-240, 1995.

WATERS, W. R. et al. Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and Vaccine*

Immunology, Washington, DC, v. 13, n. 6, p. 611-619, 2006.

WATERS, W. R.; BUDDLE, B. 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*, Washington, DC, v. 18, n. 11, p. 1.882-1.888, 2011.

WATERS, W. R.; PALMER, M. V. et al. Tuberculosis immunity: Opportunities from studies with cattle. *Clinical and Developmental Immunology*, Abingdon, v. 2.011, p. 1-11, 2011.

WELSH, M. D. et al. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, Oxford, v. 114, n. 1, p. 101-111, 2005.

WHELAN, A. O. et al. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 48, n. 9, p. 3.176-3.181, 2010.

WHELAN, C. 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*, Columbia, MO, v. 3, n. 23, p. 499-503, 2011.

WIKER, H. G. MPB70 and MPB83 – major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oslo, v. 69, n. 6, p. 492-499, 2009.

WOBESER, G. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: An updated history. *The Canadian Veterinary Journal*, Guelph, Ont., v. 50, n. 11, p. 1.169-1.176, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764465/pdf/cvj_11_1169.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2011.

ZANINI, M. S. et al. *Mycobacterium bovis*: Polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 809-813, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v96n6/4197.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

**Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra
Mycobacterium bovis por ELISA**

Ingrid Ieda Fernando de Souza^{*}, Elaine Silva de Pádua Melo, Carlos Alberto do Nascimento Ramos, Thaís de Andrade Farias, Ana Luiza Alves Rosa Osório, Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge, Carlos Eugênio Soto Vidal, Altino de Souza e Silva, Márcio Roberto Silva, Aiesca Oliveira Pellegrin, Flávio Ribeiro de Araújo

*Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte. BR 262, km 4, CEP 79.002-970, Campo Grande, MS; Telefone: +55 (67) 3368-2085; E-mail: ingridsbio2005@gmail.com.

Periódico: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

RESUMO

A tuberculose bovina é uma importante doença infecciosa crônica, causada pela bactéria *Mycobacterium bovis*, responsável por consideráveis perdas econômicas, além de constituir problema de saúde pública. Os programas de controle da enfermidade realizados na maioria dos países são baseados na identificação e eliminação de animais infectados. A utilização de um teste sorológico, como o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), pode incrementar a cobertura diagnóstica desta doença. Assim, o objetivo neste estudo foi produzir proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e uma quimera com fragmentos hidrofílicos de MPB70, MPB83 e ESAT-6 de *M. bovis* e avaliá-las como antígenos em ensaios ELISA. Os genes foram clonados no plasmídeo *pET-47b(+)*, com exceção de *mpb83*, clonado em *pRSET-C*, e *tb10.4* clonado em *pET-28a(+)*, sendo expressos em *Escherichia coli* Rosetta. Após purificação por cromatografia de afinidade, as proteínas foram testadas por ELISA com 107 soros de bovinos positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC) e 126 soros de animais negativos ao TCC. Detectaram-se sensibilidades entre 28% e 83,2%; e especificidades entre 58,7% e 92,9%. Os testes com ESAT-6, MPB83 e PE5 tiveram concordância média (índices *kappa* de 0,447; 0,554 e 0,404, respectivamente) e a quimera, uma boa concordância (índice *kappa* de 0,688) com o TCC. Os testes com as demais proteínas tiveram concordâncias mínimas com o TCC. Sugere-se que a combinação do ensaio ELISA utilizando a quimera com os testes intradérmicos pode melhorar a cobertura diagnóstica da tuberculose bovina.

Palavras-chave: tuberculose bovina - proteínas recombinantes - CFP-10 - ESAT-6 - Mb0143 - MPB83 - PE5 - PE13 - TB10.4 - TB15.3 - ELISA.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma enfermidade infecciosa e crônica causada pela bactéria *Mycobacterium bovis* que acomete bovinos (Karlson e Lessel 1970, Wobeser 2009), outras espécies de animais de exploração zootécnica, animais silvestres livres ou em cativeiro e também o homem (Gutiérrez et al. 1998). Assim, ocasiona prejuízos à pecuária e riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal (Lilenbaum et al. 2001).

No curso da infecção por *M. bovis*, a maioria dos bovinos desenvolve resposta imune celular detectada em reações de hipersensibilidade tardias após a inoculação intradérmica de antígenos da bactéria, sobretudo derivado protéico purificado (PPD) (Whelan et al. 2011). Este teste tem sido usado em diversas partes do mundo, incluindo o Brasil, para o controle dessa enfermidade (Marassi et al. 2010). No entanto, apesar da eficácia do teste, existem limitações quanto à especificidade, devido a reações cruzadas com micobactérias ambientais (Fráguas et al. 2008, Monaghan et al. 1994) exigindo a realização de testes comparativo com PPD de *Mycobacterium avium*. Além disso, alguns animais reagentes positivos não são detectados no teste de tuberculinização intradérmica, os quais permanecem como fontes de infecção para outros bovinos. Mesmo em países que utilizam testes de detecção de Interferon-gama (IFN- γ) como provas confirmatórias auxiliares há relatos de bovinos com tuberculose não detectados (Whelan et al. 2011).

Um teste sorológico com sensibilidade e especificidade capaz de detectar anticorpos contra *M. bovis* em bovinos que estão expostos à doença poderia ser usado complementando o teste intradérmico, pois embora as infecções micobacterianas possuam primariamente resposta imune celular, também há resposta humoral especialmente quando a doença está em estágio avançado (Adams 2001).

Os testes sorológicos com proteínas recombinantes do Complexo *M. tuberculosis* podem constituir uma alternativa prática para detecção de rebanhos infectados, complementando a cobertura diagnóstica fornecida pelos testes de tuberculinização. Alguns antígenos recombinantes já foram testados com sucesso e estão disponíveis comercialmente, como MPB70 e MPB83 (Waters et al. 2011), e outros tem sido apontados e/ou testados como promissores para testes sorológicos e/ou celulares, tais como CFP-10, ESAT-6, PE5, PE13, Mb0143, TB10.4, TB15.3 (Lyashchenko et al. 1998, Amadori et al. 2002, Weldingh et al. 2005, Aagaard et al. 2006, Liu et al. 2007, Meikle et al. 2009)

Assim, o objetivo neste estudo foi produzir proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e uma quimera com fragmentos hidrofílicos de MPB70, MPB83 e ESAT-6 de *M. bovis* e avaliá-las como antígenos em ensaios ELISA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Purificação de DNA de Mycobacterium bovis - Foi extraído DNA da cepa AN5 de *M. bovis* obtida por cultura em meio Stonebrink e purificado utilizando o kit comercial *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen). A qualidade e concentração do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) e por eletroforese em gel de agarose corado com *Syber Gold* (Invitrogen) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

Amplificação dos genes de interesse - Oligonucleotídeos iniciadores (Tabela I) foram desenhados para amplificação dos genes, com o auxílio do programa PrimerSelect (DNASar). Os fragmentos de DNA que codificam para as proteínas foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), contendo 20 mM Tris pH 8,4, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl₂, 250 mM de cada dNTP, 100 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 100 ng de DNA de *M. bovis*. Os perfis de amplificação foram realizados de acordo com a característica de cada par de oligonucleotídeos iniciadores. Os produtos das PCRs foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% corados com *Syber Gold* (Invitrogen) e visualizados em transiluminador ultravioleta.

Produção da quimera - A quimera composta por fragmentos dos genes *esat-6*, 221989-222198 (BX248341.1, fragmento 14/14), *mpb70* 18693-19025 (BX248344.1, fragmento 11/14) e *mpb83* 15664-15966 (BX248344.1, fragmento 11/14) foram sintetizados pela empresa Genone. A análise dos fragmentos hidrofílicos para a composição da quimera foi realizada com o auxílio do programa Protean (DNASar). A quimera, cuja sequência está descrita na figura 1 foi clonada em *pET-47b (+)* (Novagen).

Clonagem e expressão dos genes - Os genes amplificados foram clonados inicialmente em plasmídeo *pGEM-T Easy* (Promega), sendo propagados em *Escherichia coli* cepa DH5 α . Após isolamento de DNA plasmidial de cada gene utilizando um kit comercial (Qiagen) efetuou-se subclonagem em sítio de *EcoRI* de *pET-47b (+)* (Novagen). O gene *mpb83* foi subclonado em *pRSET-C* (Invitrogen) e o gene *tb10.4* foi subclonado em *pET-28a (+)*

(Novagen). Como célula hospedeira, foi utilizada *Escherichia coli* cepa Rosetta em todas as construções gênicas. A expressão dos genes foi verificada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) corados com azul brilhante de comassie.

Produção e purificação das proteínas recombinantes - Erlenmeyers contendo 50 mL de caldo LB (Luria Bertani Miller) com 34 µg/mL de clorafenicol e 25 µg/mL de kanamicina foram pré-inoculados com uma colônia da bactéria para os genes subclonados em *pET-47b* (+) contendo cada plasmídeo recombinante. Para os genes subclonados em *pRSET-C* foi utilizado caldo LB contendo 34 µg/mL de clorafenicol e 100 µg/mL de ampicilina. Todas as suspensões bacterianas foram cultivadas a 37° C, por 12 horas, a 200 rotações por minuto (rpm). Cada crescimento resultante foi inoculado em 450 mL de caldo LB e as suspensões foram incubadas por uma hora a 37° C, a 200 rpm. A indução de cada expressão gênica foi realizada com 1 mM de isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo (IPTG) por incubação a 37° C, por quatro horas a 200 rpm. As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e cada sedimento foi tratado e ressuspensão com 15 mL de tampão de lise (Na₂HPO₄ 20mM; NaCl 0,5M; Guanidina HCl 6M) pH 8,0, por incubação por uma hora em banho maria a 37°C. Em seguida, foram submetidas à disrupção ultrassônica por 5 vezes de 20 segundos, com intervalo de 30 segundos e potência de 100 W, em gelo. Os lisados obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram submetidos à cromatografia de afinidade, em condições desnaturantes, com a coluna de agarose níquel *His trap HP* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Após diálise em PBS por 48 horas, a 4°C, cada proteína recombinante produzida foi avaliada por SDS-PAGE, conforme descrito anteriormente, e *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-6xhistidina. Posteriormente, as proteínas purificadas foram quantificadas em gel SDS-PAGE, comparando-se a padrões de albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações 0,125 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL. As proteínas foram concentradas para uma concentração de 1 mg/mL e solubilizadas com SDS 2%, para posterior utilização no Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA). As massas das proteínas recombinantes foram obtidas pelo programa Labimage 1D 2006 (Kapelan).

Padronização dos ELISAs - As diluições ótimas das proteínas recombinantes, soros, conjugado e tampões utilizados nos ensaios, como também o tempo de parada da reação enzimática foi determinado pela avaliação de quatro soros de bovinos positivos e quatro soros de bovinos negativos para tuberculose pelo Teste Cervical Comparativo (TCC), segundo o

Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (Brasil 2004). Após o estabelecimento das condições ótimas, os antígenos foram adsorvidos em placas de poliestireno de 96 poços (Costar 3590), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6, por uma hora a 37°C. Nas concentrações descritas na tabela II, as placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de tampão fosfato com 0,01% de Tween 20 (PBST) e 5% de leite desnatado, pH 7,2, por 1 hora a 37°C. Após cinco lavagens com PBST, 100 µL/poço dos soros, diluídos em PBST com 2% de leite desnatado, foram incubados por 1 hora a 37°C. As placas foram então lavadas mais cinco vezes com PBST, e 100 µL/poço de conjugado anti-IgG bovino com peroxidase (Sigma, A5295), diluído em PBST a 1:10.000 adicionados aos poços. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C, e após cinco lavagens com PBST, 50 µL/poço do cromógeno/substrato Fast OPD (Sigma, P9187) foram adicionados. As reações foram interrompidas pela adição de H₂SO₄ (2,5N) e os resultados obtidos em leitor EL-800 (Bio-Tek), com filtro de 490 nm. A normalização das absorbâncias foi feita segundo o protocolo descrito por Ramanakumar et al. (2010).

Avaliação do desempenho dos ELISAs - Após a padronização dos ELISAs, foram testados soros de 126 bovinos negativos ao TCC provenientes da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul; e um total de 107 bovinos positivos ao TCC, provenientes dos Estados de Mato Grosso do Sul (município de Caarapó - 58 animais), Espírito Santo (município de Itapemirim - 6 animais) e Rio Grande do Sul (municípios de Toropi - 27 animais, Tapera - 3 animais, São Martinho da Serra - 3 animais e Santa Maria - 10 animais).

Análise estatística - Os pontos de corte para os ensaios foram determinados por curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC), utilizando os valores de absorbância obtidos a partir dos soros de bovinos negativos e positivos para *M. bovis* no TCC. Para este ponto de corte, também foram determinadas a sensibilidade e especificidade de cada teste. A curva ROC de cada ensaio foi obtida com o programa MedCalc versão 9.6.4.0, e as proporções de resultados concordantes entre os ELISAs e o TCC foram avaliados pelo índice *kappa*, calculados com o programa BioStat 5.0. As classificações das concordâncias foram determinadas segundo o critério de Ansari-Lari (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fragmentos correspondentes à região codificante dos genes *cfp-10*, *esat-6*, *mb0143*, *mpb83*, *pe5*, *pe13*, *tb10.4*, *tb15.3* foram amplificados por PCR, gerando produtos de 300, 288, 459, 604, 219, 270, 231 e 408 pares de bases (pb), respectivamente.

Na análise da expressão dos genes por SDS-PAGE, foi possível visualizar as proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e a quimera com 13,6; 12,9; 20,5; 28,5; 12,5; 17,5; 11,6; 17,5 e 35 kilodaltons (KDa), respectivamente. As massas observadas das proteínas recombinantes foram compatíveis com a análise feita no programa EditSeq (DNASStar), a partir da tradução *in silico* das sequências codificantes de cada gene, associadas às sequências codificantes dos vetores plasmidiais. No *Western blot*, todas as proteínas recombinantes deste estudo foram reconhecidas pelo anticorpo anti-6xhistidina, confirmando a expressão dos genes (Figura 2).

Na padronização dos testes, as diluições ótimas para as proteínas recombinantes e soro estão descritas na Tabela II.

As distribuições das absorvâncias normalizadas dos testes ELISA estão demonstradas na figura 3. As sensibilidades dos testes variaram entre 28% e 83,2%, e especificidades entre 58,7% e 92,9%. Pela análise do teste *kappa*, com critério de interpretação de Ansari-Lari (2005), o ELISA com a quimera recombinante apresentou boa concordância com o TCC, com índice *kappa* de 0,688. Os ensaios com as proteínas recombinantes ESAT-6, MPB83 e PE5 apresentaram concordância média com o TCC, com índices de 0,447; 0,554; 0,404, respectivamente. Os demais ensaios apresentaram concordâncias mínimas com o TCC (índices *kappa* inferiores a 0,4) (Tabela III).

O teste de tuberculização intradérmica cervical comparativa é uma prova de diagnóstico baseado na resposta celular dos animais a *M. bovis*. Apesar de apresentar sensibilidades entre 74,4% e 88,4% e especificidades entre 97,3% e 98,6% (Farnham et al. 2011), este teste é bastante laborioso, já que necessita a contenção dos bovinos para tricotomia, leitura da espessura cutânea e inoculação intradérmica das tuberculinas. Além disso, após 72 horas, é necessária nova contenção para leitura dos resultados (Whelan et al. 2010), o que limita a execução do teste em rebanhos numerosos. Além disso, animais com tuberculose podem apresentar resultados falso-negativos e permanecerem nos rebanhos como

fontes de infecção, devido principalmente à anergia, que pode ocorrer em bovinos cronicamente infectados com *M. bovis* (Neill et al. 2001, Gormley et al. 2006).

Para realização dos ensaios ELISA é necessário manejar os animais uma única vez para coleta de sangue, procedimento este que ainda pode ser otimizado coletando-se em um único momento amostra suficiente para realização do diagnóstico de outras enfermidades como, por exemplo, a brucelose. Além disso, esse procedimento diagnóstico não altera o estado imunológico do animal interferindo em exames subsequentes, como é o caso da tuberculinização (Medeiros et al. 2010). Com os ensaios ELISA, também há possibilidade de testar grande número de amostras em curto espaço de tempo e a automação na obtenção dos resultados diminui a probabilidade de erros (Soares 2001).

Os ensaios com as proteínas recombinantes ESAT-6, MPB83 e PE5 apresentaram uma concordância média com o TCC, sendo que ESAT-6 e MPB83 já foram utilizadas por outros autores em testes sorológicos (Marassi et al. 2010, Waters et al. 2011, Whelan et al. 2011) e apresentaram resultados promissores para diagnóstico da tuberculose bovina. A PE5 foi avaliada somente em testes celulares (Aagaard et al. 2006), sendo esse estudo a primeira descrição da utilização desse antígeno em ensaio ELISA apresentando uma média concordância com o TCC.

A boa concordância entre os testes e a melhor sensibilidade nos ELISAs foram obtidos quando utilizou-se a quimera que contém fragmentos das proteínas ESAT-6, MPB70 e MPB83. Com isso, acredita-se que a maior diversidade de epitopos resulta em um aumento significativo da sensibilidade do teste.

Os antígenos ESAT-6, MPB70 e MPB83 já foram utilizados em modelos experimentais para detecção de anticorpos contra *M. bovis* e foram identificados como tendo importantes epitopos de células B que podem ser explorados para o sorodiagnóstico dessa infecção (Lightbody et al. 2000, Lyashchenko et al. 1998, McNair et al, 2001).

Os resultados do ELISA com a quimera de ESAT-6, MPB70 e MPB83 encontrado neste estudo (sensibilidade de 83,2%, e especificidade de 86,5%) foram semelhantes aos encontrados em outro estudo usando outra quimera com os mesmos antígenos, no qual obteve-se uma sensibilidade de 69,4% e uma especificidade de 96% (Liu et al. 2007). Além disso, um teste ELISA comercial para anticorpos contra *M. bovis*, usando os antígenos recombinantes MPB70 e MPB83 forneceu bom desempenho com sensibilidade de 63% e

especificidade de 98% em bovinos naturalmente infectados (Waters et al. 2011). Estes resultados demonstram o potencial destes antígenos em testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *M. bovis*.

A fusão de epitopos de ESAT-6, MPB70 e MPB83 apresentou melhor desempenho do que os ensaios com ESAT-6 e MPB83 separadamente. Neste estudo, não foi possível avaliar o desempenho da MPB70 isoladamente, devido a problemas na purificação da mesma (dados não demonstrados). Isto se deve, provavelmente, à resposta imune humoral de bovinos a *M. bovis* que reconhece diferentes antígenos em fases distintas da infecção. Portanto, a fusão de epitopos amplia a cobertura diagnóstica (Lyashchenko et al. 1998, Meikle et al. 2009, Whelan et al. 2011).

Devido à boa concordância entre o ELISA com a quimera de ESAT-6, MPB70 e MPB83 e o TCC, sugere-se a combinação destes dois testes, que detectam respostas humorais e celulares, respectivamente, e é capaz de detectar animais em diferentes fases da infecção, como consequência torna-se uma estratégia promissora para melhorar a cobertura diagnóstica da tuberculose bovina.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro da EMBRAPA Macroprograma 2 (processo 02.08.06.004) e Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – edital CTAGRO/MAPA (processo 505837/2008-0).

REFERÊNCIAS

- Adams LG 2001. *In vivo* and *in vitro* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Rev Sci Tech* 10: 304-324.
- Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Vallecillo AJ, Gutierrez-Pabello JA, Suarez-Güemes F, McNair J, Cataldi A, Espitia C, Andersen P, Pollock JM 2006. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and epecificity. *J Clin Microbiol* 44: 4326-4335.
- Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, Pollock JM, Zerbini I 2002. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 85: 379-389.

- Ansari-Lari M 2005. Comparison between two tests results, k statistic instead of simple overall agrément. *Vet Parasitol* 133: 369-370.
- Brasil 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Sanitária. Instrução Normativa n. 6, de 8 de janeiro de 2004. Aprova o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, seção 1, p. 6-10, 12 jan.
- Farnham MW, Norby B, Goldsmith TJ, Wells SJ 2011. Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. *Prev Vet Med* 103: 234-242.
- Fráguas AS, Cunha-Abreu MS, Ferrira AMR, Marassi CD, Oelemann W, Fonseca LS, Ferreira R, Lilenbaum W 2008. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais regentes à tuberculinização. *R Bras Ci Vet* 15: 117-121.
- Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet Microbiol* 112: 171-179.
- Gutiérrez M, Tellechea J, Garcia Marin JF 1998. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet Microbiol* 62: 281 -290.
- Karlson AG, Lessel EF 1970. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 20: 273-282.
- Lightbody KA, McNair J, Neill SD, Pollock JM 2000. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Vet Microbiol* 75: 177-188.
- Lilenbaum W, Pessolani MCV, Fonseca LSF 2001. The use of Ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. *J Vet Med* 48: 161-166.
- Liu S, Guo S, Wang C, Shao M, Zhang X, Guo Y, Gong Q 2007. A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of bovine Tuberculosis. *Tuberculosis* 87:212-217.
- Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, Gennaro ML 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 66: 5344-5449.
- Marassi CD, McNair J, Pollock J, Ristow P, Fonseca LS, Oelemann WMR, Lilenbaum W 2010. The use MPB70 and MPB83 to distinguish between bovine tuberculosis and paratuberculosis. *Comp Immun Microbiol Infect* 33: 485-489.
- McNair J, Corbett RM, Girvin DPM, Pollock JM 2001. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. *Scand J Immunol* 53: 365-371.
- Medeiros LS, Marassi CD, Figueiredo EES, Lilenbaum W 2010. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Braz J Microbiol* 41: 531-541.

- Meikle V, Alito A, Llera AS, Gioffré A, Peralta A, Buddle BM, Cataldi A 2009. Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. *Clin Vaccine Immunol* 16: 1352-1359.
- Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ 1994. The tuberculin test. *Vet Microbiol* 40: 111-124.
- Neill SD, Bryson DG, Pollock JM 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 81: 79-86.
- Ramanakumar AV, Thomann P, Candeias JM, Ferreira S, Villa LL, Franco EL 2010. Use of the normalized absorbance ratio as an internal standardization approach to minimize measurement error in Enzyme-Linked Immunosorbent assays for diagnosis of human Papillomavirus infection. *J Clin Microbiol* 48: 791-796.
- Soares CO 2001. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. Técnicas imunoenzimáticas. In: Madruga CR, Araújo FR, Soares CO, *Imunodiagnóstico em medicina veterinária*, Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p. 145-178.
- Waters WR, Buddle BM, Vordermeier HM, Gormley E, Palmer MV, Thacker TC, Bannantine JP, Stabel JR, Linscott R, Martel E, Milian F, Foshaug W, Lawrence JC 2011. Development and evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 18: 1882-1888.
- Weldingh K, Rosenkrands I, Okkels LM, Doherty M, Andersen P 2005. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *J Clin Microbiol* 43: 57-65.
- Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Breadon EL, McNair J, Hewinson GR, Vordermeier MH 2010. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *J Clin Microbiol* 48: 3176-3181.
- Whelan C, Shuralev E, Kwok HF, Kenny K, Duignan A, Good M, Davis WC, 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* 3: 499-503.
- Wobeser C 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: An updated history. *Can J Vet Res* 50: 1169-1176.

TABELAS

Tabela I: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes de *Mycobacterium bovis*

Genes	Tamanho dos amplicons	Sequências
<i>cfp-10</i>	300	5' GCAGAGATGAAGACCGATGCCGCTACC 3' 3' TCACAAGCCCATTTGCGAGGACAGC 5'
<i>esat-6</i>	288	5' ATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTC 3' 3' CTATGCGAACATCCCAGTGAC 5'
<i>mb0143</i>	459	5' GCTTCGGAGTTCTCCCGTGCTGAA 3' 3' CTCGTGCGAGGGTGCCCAACTCCT 5'
<i>mpb83</i>	604	5' ATGATCAACGTTTCAGGCCA 3' 3' GAACTCCGCCACATAACCAA 5'
<i>pe5</i>	219	5' ATGACGTTGCGAGTGGTTC 3' 3' TCAGCCGCCACGAC 5'
<i>pe13</i>	270	5' TCTTTCGTGATGGCATAACC 3' 3' GACTTCAGTGGCCGAA 5'
<i>tb10.4</i>	231	5' ATGTACAACACTACCCGCGAT 3' 3' CATGGTGTGGCTTCATG G 5'
<i>tb15.3</i>	408	5' AGCGCCTATAAGACCGTGGTGGTA 3' 3' CTTGGCCCGCGTGACACATTGG 5'

Tabela II: Concentração das proteínas e as diluições dos soros utilizados para a realização dos ELISAs para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*

Proteínas recombinantes	Diluições ótimas	
	Soros	Proteínas (concentração final em $\mu\text{g/mL}$)
CFP-10	1: 600	1: 10.000/ 0,1
ESAT-6	1: 600	1: 5.000/ 0,2
Mb0143	1: 600	1: 10.000/ 0,1
MPB83	1: 600	1: 10.000/ 0,1
PE5	1: 400	1: 500/ 2
PE13	1: 600	1: 500/ 2
TB10.4	1: 400	1: 2.000/ 0,5
TB15.3	1: 400	1: 5.000/ 0,2
Quimera ^(a)	1: 600	1: 5.000/ 0,2

a: quimera – fusão de fragmentos de MPB70, MPB83 e ESAT-6, sintetiza pela empresa Genone.

Tabela III: Principais parâmetros dos ELISAs com proteínas recombinantes de *Mycobacterium bovis*

Proteínas	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Índice <i>kappa</i>	Intervalo de confiança 95%	Classificação das concordâncias ^(a)
CFP-10	28,0	92,9	0,202	0,071-0,334	Mínima
ESAT-6	70,1	75,4	0,447	0,332-0,562	Média
Mb0143	67,3	71,4	0,386	0,268-0,506	Mínima
MPB83	68,2	87,3	0,554	0,447-0,663	Média
PE5	59,8	81,0	0,404	0,286-0,524	Média
PE13	65,4	58,7	0,231	0,106-0,355	Mínima
TB10.4	56,1	80,2	0,368	0,246-0,489	Mínima
TB15.3	66,4	73,8	0,394	0,276-0,513	Mínima
Quimera ^(b)	83,2	86,5	0,688	0,595-0,782	Boa

a : Classificação da concordância entre ELISA e TCC segundo Ansari-Lari (2005)

b : Quimera – fusão de fragmentos de MPB70, MPB83 e ESAT-6.

FIGURAS

Figura 1: Sequência de DNA da quimera composta por fragmentos dos genes *mpb70*, *mpb83* e *esat-6* de *Mycobacterium bovis*

```
GCCTCGGTGCAGGGAATGTCGCAGGACCCGGTCGCGGTGGCGGCCTCGAACAATCCG
GAGTTGACAACGCTGACGGCTGCACTGTCGGGCCAGCTCAATCCGCAAGTAAACCTG
GTGGACACCCTCAACAGCGGTGAGTACACGGTGTTTCGCACCGACCAACGCGGCATTT
AGCAAGCTGCCGGCATCCACGATCGACGAGCTCAAGACCAATTCGTCACTGCTGACC
AGCATCCTGACCTACCACGTAGTGGCCGGCCAAACCAGCCC GGCCAACGTGCTCGGC
ACCGGTCAGACCCTCCAGGGCGCCAGCGTGACGGTGACCGGTCAGGGTGC GCAAGAC
CCGGTTCGCTACCGCGGCTTCCAACAACCCGATGCTCAGTACCCTGACCTCGGCTCTG
TCGGGCAAGCTGAACCCGGATGTGAATCTGGTCGACACCCTCAACGGCGGCGAGTAC
ACCGTTTTTCGCCCCCACCACGCCGCATTCGACAAGCTGCCGGCGGCCACTATCGAT
CAACTCAAGACTGACGCCAAGCTGCTCAGCAGCATCCTGACCTACCACGTGATAGCC
GGCCAGGCGAGTCCGAGCAGGATCGACGGCACCCATCAGACCCTGCAAGGTGCCGAC
CTGACGGTGAATGTCACGTCCATTCATTCCCTCCTTGACGAGGGGAAGCAGTCCCTG
ACCAAGCTCGCAGCGGCCTGGGGCGGTAGCGGTTCCGGAGGCGTACCAGGGTGTCCAG
CAAAAATGGGACGCCACGGCTACCGAGCTGAACAACGCGCTGCAGAACCTGGCGCGG
ACGATCAGCGAAGCCGGTCAGGCAATGGCTTCGACCGAAGGCAACGTC
```

Legenda: *mpb70* *mpb83* *esat-6*

Posição no genoma:

18693-19025 de *mpb70* (BX248344.1, fragmento 11/14).

15664-15966 de *mpb83* (BX248344.1, fragmento 11/14).

221989-222198 de *esat-6* (BX248341.1, fragmento 14/14).

Figura 2: *Western blot* com as proteínas combinantes de *Mycobacterium bovis* e anticorpo monoclonal anti-6xhistidina. 1= CFP-10, 2= ESAT-6, 3= Mb0143, 4= MPB83, 5= PE5, 6= PE13, 7= TB10.4, 8= TB15.3, 9= Quimera (MPB70/MPB83/ESAT-6)

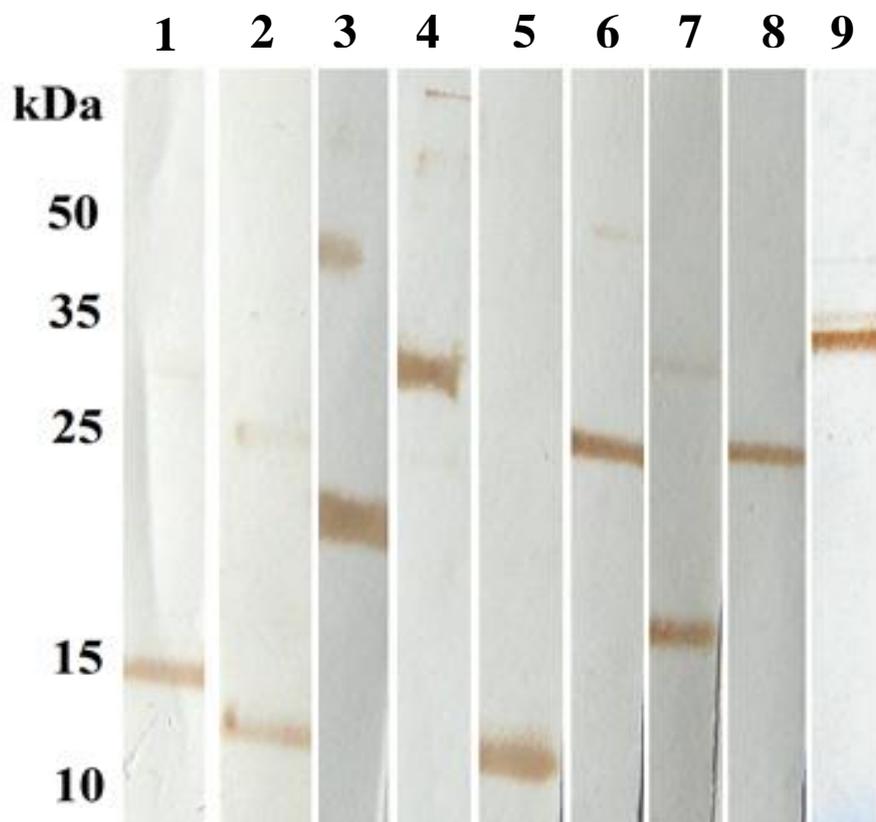


Figura 3: Distribuições das absorvâncias normalizadas dos testes ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*

