

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

FACULDADE DE VETERINÁRIA

MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA VETERINÁRIA E
REPRODUÇÃO ANIMAL

LUCIANA DOS SANTOS MEDEIROS

**ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR NO DIAGNÓSTICO
DA TUBERCULOSE BOVINA**

NITERÓI
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANA DOS SANTOS MEDEIROS

ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR NO DIAGNÓSTICO
DA TUBERCULOSE BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Clínica e Reprodução Animal.

ORIENTADOR: PROF. DR. WALTER LILENBAUM

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ANA MARIA REIS FERREIRA

NITERÓI
2009

LUCIANA DOS SANTOS MEDEIROS

ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR NO DIAGNÓSTICO
DA TUBERCULOSE BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Clínica e Reprodução Animal

Aprovada em 07 de agosto de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walter Lilenbaum – orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Renato Varges
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Rafael Silva Duarte
Universidade Federal do Rio de Janeiro

NITERÓI
2009

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walter Lilenbaum, pelo profissionalismo, dedicação e orientação. Obrigada pelos ensinamentos e motivação.

Ao Prof. Dr. Rafael da Silva Duarte, Prof^a. Dra. Leila Fonseca e ao técnico de laboratório Marlei Gomes da Silva pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

À Prof^a Dra Ana Ferreira, pela co-orientação e perspectiva de novos trabalhos.

Aos cientistas e amigos que constituem a equipe do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFF, em especial Renato Vargas, Bruno Penna, Carla Dray, Rodrigo Martins e Gabriel Martins.

Aos amigos do Centro Pan-americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS pelo incentivo e oportunidades, em especial aos Drs. Victor Saraiva, José Naranjo, Antônio Mendes, Mônica Martini e Júlio Pompei e Sra. Raquel Paubel.

Ao meu marido Breno por compartilhar fielmente de todos os momentos.

À toda minha família, em especial meus pais André e Elizabeth, minhas irmãs Aline e Amanda e minha avó Antônia por me incentivar a continuar no caminho da contínua busca por conhecimento.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ e FLAP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram neste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de tabelas. p. 7

Lista de figuras. p. 8

Resumo. p. 9

Abstract. p. 10

1. INTRODUÇÃO. p. 11

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA. p. 13

2.1. ASPECTOS GERAIS. p. 13

2.2. A DOENÇA. p. 14

2.3. TRANSMISSÃO. p. 14

2.4. POTENCIAL ZONÓTICO. p. 16

2.5. INCIDÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA. p. 18

2.6. MICROBIOLOGIA E ECOLOGIA. p. 18

2.7. ANTÍGENOS. p. 19

2.8. RESPOSTA IMUNE. p. 20

2.9. DIAGNÓSTICO. p. 23

2.9.1. Métodos Diretos – Evidenciação do Agente. p. 23

2.9.1.1. Exame direto – Baciloscopia. p. 23

2.9.1.2. Cultivo bacteriológico. p. 23

2.9.2. Métodos Indiretos. p. 24

2.9.2.1. Testes tuberculínicos intradérmicos. p. 24

2.9.2.2. Testes com base na imunidade celular. p. 25

2.9.2.3. Análises sorológicas. p. 27

3. OBJETIVO GERAL. p. 29

3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS. p. 29

4 - MATERIAL E MÉTODOS. p. 30

4.1. DESENHO DO ESTUDO. p. 30

- 4.1.1 Caracterização do rebanho e testes “*in vivo*”. p.30
- 4.1.2 Seleção dos animais para realização dos testes “*in vitro*”. p.30
- 4.1.3 Seleção dos animais para abate. P. 31
- 4.2. TESTES TUBERCULÍNICOS INTRADÉRMICOS. p. 31
- 4.3. TESTES BASEADOS EM RESPOSTA CELULAR (IFN- γ). p. 31
- 4.4. PROCESSAMENTO BACTERIOLÓGICO. p. 32
- 4.4.1. Processamento das amostras e preparação de esfregaços p. 32
- 4.4.2. Descontaminação e cultura bacteriana. p. 33
- 4.4.3. Identificação bacteriana. p. 35
- 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA. p. 35

5. RESULTADOS. p. 37

- 5.1. TESTES TUBERCULÍNICOS INTRADÉRMICOS. p. 37
- 5.2. DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTA IMUNE DO TIPO CELULAR (IFN- γ) . p. 37
- 5.2.1. Dia zero – momento da inoculação com PPD. p. 37
- 5.2.2. Dia sete pós inoculação com PPD. p. 40
- 5.2.3. Dia 21 pós inoculação com PPD. p. 40
- 5.2.4. Análise estatística. p. 40
- 5.3. PROCESSAMENTO BACTERIOLÓGICO. p. 41
- 5.3.1. Preparo de esfregaços. p. 41
- 5.3.2. Cultura bacteriana. p. 41
- 5.3.3. Identificação bacteriana. p. 42

6. DISCUSSÃO. p. 46

7. CONCLUSÃO. p. 52

8. OBRAS CONSULTADAS. p. 53

9. ANEXOS. p. 71

ANEXO I. p. 72

ANEXO II. p. 73

ANEXO III. p. 74

ANEXO IV. p. 75

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Tabela 1: Resultados do Teste Cervical Simples (TCS) e Teste Cervical Comparado (TCS) dos animais do grupo A (cor amarela) e grupo B (cor azul). p. 38
- TABELA 2 - Tabela 2: Resultados dos Testes de Interferon- γ (IFN) realizados nos dias zero, sete e 21 p.i. nos animais do grupo A (cor amarela) e grupo B (cor azul). p. 39
- TABELA 3 - Tabela 3: Confirmação molecular das colônias de *Mycobacterium bovis* isoladas de 34 amostras de tecidos bovinos provenientes de animais dos grupos A (reativos) e B (controle). p. 44

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Seqüência do processamento, descontaminação das amostras provenientes de animais dos grupos A e B e semeadura em meios Lowenstein-Jensen acrescido de piruvato a 0,5% e Stonebrink. p. 34
- Fig. 2 Diagrama de Venn: Recuperação de colônias de *Mycobacterium bovis* de tecido bovino de 34 amostras provenientes de animais dos grupos A e B utilizando três métodos de descontaminação. p. 43

RESUMO

Em diversos países, a tuberculose bovina, causada pelo *Mycobacterium bovis*, é um problema econômico e de saúde pública. Mundialmente, são implementados programas de erradicação da enfermidade com políticas baseadas em testes tuberculínicos e abate dos animais reativos. Com o objetivo de auxiliar a erradicação da tuberculose bovina, este estudo avaliou o uso de técnicas imunológicas e bacteriológicas em um rebanho naturalmente infectado com *Mycobacterium bovis*. Na primeira etapa, um rebanho leiteiro com 274 vacas mestiças foi submetido a testes tuberculínicos intradérmicos. Após essa etapa, o teste Interferon- γ (IFN) foi empregado em amostras provenientes de 32 vacas reativas e em outros 18 animais negativos aos testes tuberculínicos intradérmicos, no dia da tuberculinização e nos dias sete e 21 após a inoculação do PPD (p.i.). A sensibilidade do IFN no momento da inoculação com PPD foi de 96,8%, enquanto a especificidade foi de 88,8%. Quando utilizado como teste confirmatório nos dias sete e 21 p.i., IFN apresentou no rebanho estudado sensibilidade de 78,8% e 75,8%, enquanto a especificidade foi de 94,1% e 84,2%, respectivamente. Animais reativos aos testes empregados foram abatidos e necropsiados, e amostras de pulmões e linfonodos foram processadas por três diferentes metodologias empregando os descontaminantes 0,75% HPC, 6% de ácido sulfúrico ou 4% NaOH. As sensibilidades de cada método de descontaminação foram respectivamente 20,6%, 37,9% e 20,6%. Não houve diferença significativa entre os métodos de descontaminação de Petroff e do ácido sulfúrico, embora o método que empregou HPC tenha se mostrado mais sensível do que os demais. Estes resultados mostram-se promissores para que possam ser sugeridos novos protocolos de diagnóstico confirmatório *ante mortem* da infecção e melhor recuperação do agente no diagnóstico *post mortem*.

Palavras-chave: Diagnóstico, tuberculose, bovino, erradicação, *Mycobacterium bovis*

ABSTRACT

In many countries bovine tuberculosis, caused by *Mycobacterium bovis*, is an economic and public health concern. For the eradication of the disease health programs are executed worldwide, under policies based on intradermal testing and slaughtering of reactive animals. To help the eradication of bovine tuberculosis, this study tested currently available immunological and biological techniques on a herd naturally infected with *Mycobacterium bovis*. In the study's first step, a dairy herd comprising 274 crossbred cows was submitted to the tuberculin skin test. After this step, the Interferon- γ test (INF) was performed on samples from 32 reactive cows and on 18 animals that had tested negative to intradermal tests. This test was performed on samples collected on the day of inoculation of purified protein derivative (PPD) (day zero), on day seven, and on day 21 after PPD inoculation (pi). Sensitivity of INF at day zero was 96.8%, while specificity was 88.8%. When used as a confirmation test on days seven and 21 pi, INF showed sensitivity of 78.8% and 75.8%, while specificity was 94.1% and 84.2%, respectively. Reactive animals to the tests performed under this study were slaughtered and tissue samples were submitted to three different procedures with the following decontaminants: 0.75% HPC, 6% sulfuric acid, and 4% NaOH. Sensitivity to the decontamination methods were respectively 20.6%, 37.9% and 20.6%. There was no significant difference between the NaOH and the sulfuric acid methods, although HPC method proved to be more sensitive than the others. Different strategies can be suggested based on these results for *ante-mortem* confirmation diagnosis of bovine tuberculosis and for better isolation of the agent in the *post mortem* diagnosis.

Keywords: Diagnosis, tuberculosis, cattle, eradication, *Mycobacterium bovis*

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (bTB) é uma doença infecciosa de ocorrência mundial causada por *Mycobacterium bovis* que determina riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal e prejuízos tanto à pecuária de corte quanto à leiteira. A forma mais freqüente da doença é a pulmonar, embora possa ainda ocorrer a forma intestinal em bezerros por meio de ingestão de leite contaminado (POLLOCK e NEILL, 2002). Entretanto, em países onde há algum programa de controle implementado, lesões intestinais não são comumente observadas devido a eliminação dos animais reativos antes da disseminação do bacilo para o úbere, e a forma intestinal é normalmente resultante da disseminação de um complexo primário (NEILL et al., 1994a).

A enfermidade é uma importante causa de perdas econômicas, tanto em relação aos rebanhos individualmente, como para a economia dos países onde esta ainda ocorre. A infecção leva à diminuição de 10 a 20% da produção de leite e do ganho de peso do gado leiteiro e causa redução da fertilidade do rebanho. Quanto aos rebanhos de corte, há a condenação de carcaças dos animais infectados, além dos prejuízos determinados pelo impedimento à exportação de carnes para países onde a tuberculose é controlada (LILENBAUM et al., 1998).

Outro grande motivo para o interesse na tuberculose bovina é a suscetibilidade do homem à doença determinada pelo mesmo agente, *Mycobacterium bovis*, que pode acometer principalmente os trabalhadores rurais. A tuberculose intestinal humana é relacionada à ingestão de leite cru e seus derivados não pasteurizados, e constitui a principal causa de manifestações não-pulmonares por esta moléstia em regiões rurais (GRANGE & YATES, 1994).

Devido a importância econômica e sanitária da doença, diversos métodos de diagnóstico da tuberculose bovina já foram desenvolvidos com variações de tipos de amostras selecionadas, sensibilidade e especificidade. Rotineiramente são classificados em métodos diretos que implicam no isolamento e visualização do agente ou parte do seu genoma, e métodos indiretos que mensuram a resposta imunológica do animal frente ao desafio com algum antígeno específico do *Mycobacterium bovis*.

O método padrão para o diagnóstico da tuberculose bovina é o teste tuberculínico intradérmico, baseado na reação de hipersensibilidade tardia ao derivado proteico purificado (PPD) extraído do agente (OIE, 2008). Entretanto o diagnóstico definitivo da infecção de um rebanho só é possível por meio da cultura bacteriológica e identificação do agente, principalmente quando a prevalência da enfermidade é baixa, durante os últimos estágios de uma campanha de erradicação (CORNER, 1994; FIGUEIREDO et al., 2008).

No Brasil o teste oficial para diagnóstico da tuberculose bovina é o alérgico cutâneo (BRASIL, 2006), pois já está estabelecido que *Mycobacterium bovis* causa uma reação do tipo hipersensibilidade tardia e que o reconhecimento dos antígenos de micobactérias pelos linfócitos T é sugerido como a principal resposta imunológica à tuberculose (ALITO et al., 2003, POLLOCK et al., 2005, WELSH et al., 2005). Entretanto Pollock e Neill (2002) mediram a função das respostas de células B e reportaram que essas células induziram a produção de anticorpos nas etapas avançadas da tuberculose bovina. Este fato foi reforçado por Welsh e colaboradores (2005), que demonstraram o progresso da resposta imunológica celular para humoral em todos os animais tuberculosos analisados. A progressão da doença pode explicar a anergia de alguns bovinos infectados aos testes comuns baseados na hipersensibilidade tardia. A ausência da resposta celular nos animais infectados ocorre em particular quando a carga bacteriana é alta (McNAIR et al., 2000).

A ocorrência de animais anérgicos e a dificuldade em se diagnosticar um rebanho como infectado decorrente de métodos bacteriológicos pouco sensíveis (CORNER, 1994) colocam em risco os programas nacionais de erradicação da tuberculose bovina. Por essas razões o presente estudo se propôs a avaliar a utilização de diferentes métodos de diagnóstico aplicados simultaneamente em um rebanho naturalmente infectado, levando em consideração o histórico do rebanho, a resposta imune à enfermidade e os aspectos microbiológicos do agente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPECTOS GERAIS

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, no período de 1989 a 1998 foi observada uma prevalência de tuberculose bovina de 1,3% no Brasil (BRASIL, 2006). No Rio de Janeiro, Lilenbaum e colaboradores (1998) testaram 1632 bovinos de aptidão leiteira em propriedades com histórico sugestivo da ocorrência de tuberculose e verificaram 12,7% de reatividade ao teste intradérmico cervical simples, alertando para a alta ocorrência da enfermidade em nosso estado. Apesar da existência comprovada da enfermidade, há uma escassez de dados oficiais atualizados referentes à prevalência da tuberculose bovina no Brasil.

A tuberculose bovina vem sendo alvo de intensa campanha de erradicação por meio de um programa nacional. O controle da enfermidade, no Brasil e em outros países onde a enfermidade é comum, baseia-se no método de “teste-e-abate. De acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que foi instituído em 2001, foi definida uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas (BRASIL, 2006). A correta detecção dos animais infectados é importante, pois a interferência na capacidade plena de produção pode ocasionar reduções de até 25% na produtividade animal (POLETTO et al., 2004).

Um dos maiores complicadores para o sucesso do plano de controle diz respeito às limitações do método de diagnóstico preconizado, a intradermoreação com PPD bovina ou com PPDs bovina e aviária. Estes métodos apresentam problemas quanto ao padrão de sensibilidade e especificidade (WOOD et al., 1991;

ROTHEL et al., 1992; FIFIS et al., 2004), variando de 68-95% de sensibilidade e 96-99% de especificidade, além de outras desvantagens, como a necessidade de duas visitas à propriedade num prazo de 72 horas (MONAGHAN et al., 1994), tornando o diagnóstico de alto custo, laborioso e sujeito a fraudes. Muitas vezes seu uso como ferramenta única de diagnóstico não permite a detecção de todos os animais infectados (LIEBANA et al., 2008), não sendo possível a completa eliminação dos focos de infecção no rebanho.

2.2 A DOENÇA

Mycobacterium bovis, agente da tuberculose bovina, é um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Apesar de um alto nível de similaridade genética entre essas espécies, as diferenças genéticas parecem estar concentradas na capacidade patogênica em relação à restrição ao hospedeiro (SREEVATSAN et al, 2000; PIERCY et al, 2007). A maioria das demais espécies de micobactérias existe principalmente como saprófitos ambientais e estão distribuídas amplamente no solo, poeira e água. Algumas dessas espécies são agentes patogênicos oportunistas para humanos e animais com capacidade para causar a doença local ou mesmo sistêmica quando em indivíduos imunocomprometidos (COLLINS, 1994).

No gado bovino, as lesões da tuberculose são com maior frequência encontradas nos órgãos ricos em tecido reticuloendotelial, em particular os pulmões e gânglios linfáticos associados, e no fígado (CORNER et al., 1990). Outro estudo realizado em gado bovino naturalmente e experimentalmente infectado demonstrou que as lesões são mais frequentemente observadas nas vias respiratórias inferiores; no entanto em um número significativo de casos as vias respiratórias e tecidos associados superiores também podem apresentar lesões (NEILL et al., 1994a; RODGERS et al., 2007). Embora os tubérculos não sejam considerados lesão patognomônica da TB bovina, a presença destes leva aos sinais clínicos da doença, que estão diretamente associados a sua distribuição e quantidade (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

2.3 TRANSMISSÃO

Embora os bovinos possam ser infectados por *M.bovis* por outras vias além de aerossóis, esta é a via de transmissão mais importante (GRIFFIN e DOLAN, 1995; POLLOCK et al., 2005; OIE, 2008). Morris e colaboradores (1994) também informaram o papel principal da via de transmissão aérea e a transmissão animal-animal. A contaminação pelos alimentos ou pelos fômites não é comum devido às baixas doses infectantes de bacilos que podem ser encontrados em condições naturais no ambiente. Este fato explica a maior ocorrência em gado leiteiro do que em gado de corte, como consequência das práticas de criação, em que o contato próximo entre os animais aumenta a possibilidade da transmissão de doenças. Este fato não se apóia nas diferenças raciais como fator de risco para ocorrência da doença, uma vez que o gado bovino de corte criado em sistema intensivo também demonstra alta susceptibilidade para a propagação da infecção. Contudo, um estudo recente de Ameni e colaboradores (2007) encontrou prevalência significativamente inferior nas raças zebus nativas, comparada ao gado bovino da raça Holandesa em condições idênticas de criação no campo, e também uma maior gravidade nas lesões encontradas em animais da raça Holandesa, o que pode sugerir também um componente racial na ocorrência da infecção. Menos comum, mas também importante, é a infecção do aparelho digestivo após a ingestão do leite ou pastagem contaminada. Outra forma menos comum de transmissão é a infecção transcutânea, enquanto que a transmissão vertical é raramente descrita em condições naturais (THOEN et al., 2006).

É importante mencionar também que várias espécies da fauna silvestre são implicadas na manutenção e transmissão de *M. bovis* em todo o mundo. Os reservatórios de fauna silvestre podem dispersar *M. bovis* por uma variedade de vias como secreções respiratórias, urina ou fezes, sendo que a via de transmissão principal dependerá do tipo de interação entre as populações de diferentes espécies (THOEN et al., 2006). A infecção ocasionada pelo *M. bovis* já foi reportada em diversas espécies animais em todo o mundo (THOEN et al., 2006; HARRINGTON et al., 2007; UNE e MORI, 2007), entre as quais estão os búfalos no Brasil (FREITAS et al., 2001), suricatos no deserto Kalahari da África do Sul (DREWE et al., 2009), texugos na Grã-Bretanha, búfalo africano na África do Sul, veado de rabo branco nos EUA e gambás na Nova Zelândia. Os texugos são reconhecidos como

reservatórios da infecção e são uma grande razão para a infecção contínua do gado bovino por *M. bovis* no Reino Unido (KAO et al., 2007). No Brasil não há dados sobre a ocorrência de *M. bovis* em animais selvagens.

A transmissão de bacilos pode ser influenciada pela idade e comportamento do animal, ambiente, clima, e pelas práticas agrícolas predominantes (POLLOCK e NEIL, 2002; LILENBAUM et al., 2007). Rajaram e colaboradores (1996) relataram que as condições climáticas na Índia, em particular as altas umidade e temperatura, favoreciam a existência e a propagação da tuberculose bovina, enquanto que na Irlanda, com diferentes condições climáticas, este fato não pode ser confirmado (HAHESY et al., 1992a). Boas práticas agrícolas de criação podem prevenir outros fatores de risco, como o adequado destino ao esterco bovino infectado (HAHESY et al., 1992 b), o controle da transmissão entre propriedades contíguas (DENNY e WILESMITH, 1999), a presença de confinamento constante (RAJARAM et al., 1996; LILENBAUM et al., 2007) e alta densidade do gado (OLIVEIRA et al., 2007), além da freqüência de assistência veterinária (LILENBAUM et al., 2007) e compartilhamento de colostros (EVANGELISTA et al., 1996).

2.4 POTENCIAL ZONÓTICO

A tuberculose zoonótica, como é chamada a infecção no homem determinada por *M. bovis*, é reconhecidamente uma ameaça à saúde pública em países em desenvolvimento. Em alguns desses países há limitada ou nenhuma medida de controle contra a tuberculose bovina (COSIVI et al., 1998; THOEN et al., 2006). A infecção humana ocasionada por *M. bovis* pode ocorrer pela via aerógena, ingestão de leite infectado (WHO, 1994), ou com menor freqüência, pelo contato com mucosas e pele lesionada (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006b). A doença causada por *M. bovis* é clínica, radiológica e patologicamente indistinguível da doença determinada por *M. tuberculosis*. Entretanto, diferente da tuberculose característica em humanos, a apresentação extrapulmonar é muito freqüente, principalmente devido à via de infecção (GRANGE, 2001). Considerando o tratamento padrão para infecções determinadas por *M. tuberculosis*, a falta de diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* pode ser um problema. *M. bovis* é naturalmente resistente a pirazinamida, um medicamento usado com freqüência para o tratamento da tuberculose nos seres humanos. Portanto, os indivíduos

infectados por *M. bovis* podem apresentar um tratamento ineficiente, que possibilitaria que os pacientes fossem potenciais transmissores dessas cepas resistentes a outras pessoas e animais (ABRAÃO et al., 2005).

Em países industrializados, a infecção humana por *M. bovis* tem sido controlada em grande parte pela pasteurização do leite de vaca, inspeção de matadouros, e testes obrigatórios de diagnóstico com abate do gado bovino reativo (ROMERO et al., 2006). No Brasil apesar da existência de um Plano Nacional de Erradicação, ainda ocorre a comercialização da carne e leite sem controle sanitário, o que representa uma ameaça à saúde pública, já que a ingestão desses produtos é uma possível via da infecção aos seres humanos (ABRAÃO et al., 2005). Em alguns países em desenvolvimento, nos quais a tuberculose bovina não é controlada, a maioria de casos humanos ocorre nas pessoas jovens devido à ingestão ou manipulação de leite contaminado (COSIVI et al., 1998). A infecção transmitida por via aérea continua a ocorrer em trabalhadores de matadouro na indústria da carne nas regiões onde a infecção ainda é prevalente no gado bovino (THOEN et al., 2006). Embora a doença humana primária seja muito rara nos países desenvolvidos onde a tuberculose bovina foi erradicada, a forma de reativação (pós-primária) da doença pode ocorrer (WHO, 1994).

Segundo a OIE (2007), a proporção dos casos de TB zoonótica no Brasil é desconhecida, uma vez que o uso de cultura bacteriológica para o diagnóstico da bTB não é empregada como uma rotina por todas as amostras (SEQUEIRA et al., 2005). Os últimos dados publicados relatando a relevância da tuberculose zoonótica no Brasil informaram a ocorrência de somente um caso em 20 anos (1987–2006) onde *M. bovis* foi confirmado como o agente etiológico de tuberculose humana (KANTOR et al., 2008). Mais recentemente, cerca de 8.000 amostras clínicas humanas foram cultivadas no mesmo laboratório para a detecção de micobactérias e nenhum isolado de *M. bovis* foi obtido (SOBRAL, 2009). Na rede de laboratórios de São Paulo (Instituto Adolfo Lutz), um total de 355.383 cultivos foram realizados no período 2001–2005 e somente duas cepas de *M. bovis* foram recuperadas de dois pacientes, um em 2001 de uma biópsia de gânglios linfáticos, e outro em 2002 de uma amostra de líquido cerebrospinal. No Laboratório de Referência do estado do Rio Grande do Sul (1997–2005), de aproximadamente 5.000 isolados micobacterianos fenotipados, nenhum *M. bovis* foi confirmado (KANTOR et al., 2008).

2.5 INCIDÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Apesar da ocorrência da doença, há uma falta de dados oficiais a respeito da prevalência atual da tuberculose bovina no Brasil. Durante o período de 1989 a 1998, os dados dos relatórios oficiais indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de vacas infectadas (BRASIL, 2008). Desde o início da execução do PNCEBT no Brasil, poucos estudos informaram a prevalência da doença, variando de 0,7% a 3,3% (RIBEIRO et al., 2003; POLETTO et al., 2004; BAPTISTA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007). Segundo a epidemiologia da doença, a maior incidência em gado leiteiro que em gado de corte também determina a distribuição geográfica da enfermidade. Roxo (2005) informou a taxa de infecção em diferentes áreas no Brasil, e não inesperadamente, a região com a menor taxa de infecção foi onde os rebanhos de gado de corte são predominantes. Contudo, estes dados representam algumas regiões em particular e não podem ser considerados para o contexto nacional. É importante ter em mente a diversidade e o enorme tamanho do rebanho brasileiro, que compreende aproximadamente 200 milhões bovinos (PAHO, 2006).

2.6 MICROBIOLOGIA E ECOLOGIA

O bacilo da tuberculose foi cultivado pela primeira vez em laboratório por Robert Koch em 1882 (COLLINS, 1994). Micobactérias são bactérias de crescimento lento, bacilos aeróbios estritos, caracterizados pela ausência das cápsulas ou dos flagelos (RUGGIERO et al., 2007). *Mycobacterium* sp. são bastonetes delgados, curvo a retos, imóveis, medindo 0,2 a 6 μ m x 1,0 a 10,0 μ m (EISENSTADT e HALL, 1995) e de acordo com Ghosh et al. (2009) podem formar esporos.

Do ponto de vista citoquímico, as micobactérias são Gram-positivas (HIRSH e ZEE, 2003, KATSUBE et al., 2007), mas a estrutura da parede celular é diferente de outras bactérias Gram-positivas. Aproximadamente a metade da massa da parede de celular está composta de grandes ácidos graxos (C70 ao C90) de cadeia ramificada chamados os ácidos micólicos (KATSUBE et al., 2007). Eles constituem o interior do folheto lipídico da parede de células micobacterianas e formam uma barreira eficaz contra a penetração de antibióticos e agentes quimioterápicos (BHAKTA et al., 2004).

A parede celular confere aos bacilos a estabilidade e resistência à coloração de Gram. Para observar os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) pela microscopia, o método de Ziehl-Neelsen ou uma técnica relacionada pode ser utilizada (HIRSH e ZEE, 2003). Em geral, os bacilos não podem tolerar a exposição ao calor, a luz solar direta ou condições secas, mas sob condições frias, escuras e úmidas os bacilos podem sobreviver mais tempo (APHIS, 2002). *M. tuberculosis* e *M. bovis* são dois patógenos que não sobrevivem fora do hospedeiro por muito tempo (COLLINS, 1994). A sobrevivência dos membros do complexo *M. tuberculosis* nos tecidos do hospedeiro parece depender da capacidade das bactérias de reorientar seu metabolismo e utilizar qualquer fonte disponível de carboidrato, nitrogênio e energia (CHEN et al., 2003).

Os agentes químicos como solução de hipoclorito de cálcio, solução de formaldeído alcalino e cal, solução de hipoclorito de cálcio clarificada, suspensão de cal fresca e solução de formaldeído alcalino são eficazes contra o bacilo, mas sua ação pode ser afetada pela concentração do produto e o tempo de exposição (RUSSELL et al., 1984). A combinação de tempo-temperatura necessária para a destruição deste organismo foi o fator primordial no estabelecimento das normas de pasteurização, aquecendo o leite a 63,5°C durante 30 minutos ou 71,1°C por 15 segundo (GRANT et al., 1996).

2.7 ANTÍGENOS

A parede de células micobacterianas tem uma grande quantidade de ácidos micólicos, que estão ligados covalentemente a açúcares como trealose e arabinose (KATSUBE et al., 2007) e são implicados na patogenia da doença (VESOSKY et al., 2004; HOTTER et al., 2005; KATSUBE et al., 2007). Os ácidos micólicos diminuem a permeabilidade da parede de células, aumentam a resistência contra a lise de bactérias, variações de temperatura e ações de antibióticos (ANONYMOUS, 2001).

Embora a estrutura da parede das micobactérias seja considerada um fator de virulência, proteínas secretadas também desempenham uma função na patogenia que conduz às respostas imunológicas. Watanabe e colaboradores (2006) enfatizaram a possibilidade de que a imunidade adaptativa humana contra a infecção micobacteriana pode envolver o reconhecimento imune dos antígenos lipídicos e protéicos derivados das micobactérias. Assim, tanto PPDs quanto

antígenos isolados são reconhecidos pelo sistema imune de animais submetidos a modelos experimentais de infecção com *M. bovis* (LESELLIER et al., 2008).

O complexo Antígeno 85 (Ag85) do MTB é implicado na patogenia devido à sua capacidade de ligação com a fibronectina e organização da parede celular micobacteriana (BELISLE et al., 1997). Apesar das proteínas do complexo Ag85 representarem uma grande parte das proteínas secretadas (WIKER et al., 1986; WIKER e HARBOE, 1992), o antígeno MPB70 secretado pelo *M. bovis*. foi identificado como um potente estimulador de linfócitos T (RADFORD et al., 1990) e um alvo de células B (LIGHTBODY et al., 2000) em gado bovino tuberculoso. A estrutura do MPB70 indica que ambos MPB70 e o seu altamente homólogo MPB83 estão envolvidos na ligação de *M. bovis* com proteínas da célula hospedeira (CHAMBERS et al., 2004).

Em adição ao papel dos antígenos já reconhecidos, a proteína-10 (CFP-10) do filtrado de cultura de *M. bovis*, uma proteína co-secretada de micobactérias, é também considerada uma potente indutora de IFN- γ sozinha (WATERS et al., 2006c) ou associada com ESAT-6, outra proteína co-secretada (THACKER et al., 2007). Outra questão importante é a presença de ambos os antígenos em cepas virulentas de *M. bovis* e sua ausência na cepa BCG (SOOP et al., 2006). No gado bovino, a completa interação de antígenos na patogenia da tuberculose ainda não é bem compreendida.

2.8 RESPOSTA IMUNE

Após a infecção, há uma interação inicial entre os macrófagos alveolares e micobactérias, que definirá os eventos posteriores e decidirá as conseqüências da exposição aos bacilos (POLLOCK e NEILL, 2002). A bactéria pode ser morta e eliminada do hospedeiro, permanecer latente no hospedeiro, levar ao desenvolvimento da tuberculose ativa, ou reativar da latência em alguma etapa no futuro (WELSH et al., 2005).

Está bem estabelecido que *Mycobacterium bovis* causa leva á uma reação do tipo hipersensibilidade tardia e que o reconhecimento dos antígenos de micobactérias pelos linfócitos T é sugerido como a principal resposta imune à tuberculose (ALITO et al., 2003, POLLOCK et al., 2005, WELSH et al., 2005). A resposta de hipersensibilidade tardia é avaliada como um indicador de uma resposta

imune do tipo celular que é consequência da infecção por *Mycobacterium* sp. (THOM et al., 2004).

No gado bovino, os linfócitos T são as primeiras células envolvidas na reação a tuberculose, demonstrando a importância da imunidade mediada por células (IMC) na tuberculose bovina (POLLOCK et al., 2005). As células CD₄, CD₈ e $\gamma\delta$ T são sub-populações dos linfócitos T envolvidos no controle da doença (POLLOCK e NEILL, 2002; BUDDLE et al., 2002; SKINNEER et al., 2003; BUDDLE et al., 2005; POLLOCK et al., 2005), mas outra população de linfócitos T (natural killer [NK] linfócitos T) também está envolvida (SKINNER et al., 2003). Pollock e Neill (2002) descreveram o possível envolvimento do linfócito T NK na infecção por *M. bovis* e, além disso, mencionaram a identificação dos neutrófilos como primeiras células associadas ao granuloma em desenvolvimento nos bovinos nas etapas iniciais da infecção, neste caso os neutrófilos poderiam estar implicados em coordenar o desenvolvimento do granuloma.

Os estudos da dinâmica de linfócitos na circulação sanguínea do gado bovino experimentalmente infectado por *M. bovis* revelaram participação seqüencial das sub-populações dos linfócitos T (BUDDLE et al., 2005); em um primeiro momento o predomínio é da célula $\gamma\delta$ T, seguida pela célula CD₄, e posteriormente uma participação mais proeminente da célula CD₈ (POLLOCK et al., 2005). A população de células CD₄ de linfócitos T realiza a maior contribuição na imunidade adquirida contra tuberculose, produzindo Interferon γ (IFN- γ) sob influência da interleucina-12 (IL-12). Os Linfócitos T CD₈ mediam seus efeitos pela produção de citocinas como IFN- γ e também apresentam atividades citotóxicas, que controlam a replicação micobacteriana. As células $\gamma\delta$ T, que estão presentes em grandes quantidades nos jovens ruminantes, conseguem reconhecer antígenos micobacterianos não proteicos, assim como antígenos protéicos (BUDDLE et al., 2002). Como uma parte da imunidade contra micobactérias, o desenvolvimento de resposta T auxiliar tipo 1 (Th1) IMC baseada, por meio da produção das citocinas como fator de necrose α (TNF- α), IL-12 e IFN- γ , é considerado essencial para ativar as rotas de macrófagos microbicidas (WELSH et al, 2005), que restringe a ativação bacteriana (BUDDLE et al., 2005).

Pollock e Neill (2002) mediram a função das respostas de células B e reportaram que essas células induziram a produção de anticorpos somente nas etapas avançadas da tuberculose bovina. Este fato foi reforçado por Welsh e

colaboradores (2005), que demonstraram o progresso da resposta imunológica celular para humoral em todos os animais tuberculosos analisados. Inicialmente os animais desenvolveram forte resposta IMC. A resposta celular claramente diminuiu como a progressão da doença, e houve o aumento da resposta humoral baseada em anticorpos IgG1. Contudo, a resposta humoral não pareceu ser capaz de controlar a infecção, a progressão da enfermidade e o aumento da carga bacteriana. Waters e colaboradores (2006b) demonstraram que o gado bovino experimentalmente infectado também pode ter uma resposta de anticorpos prematura, com a detecção de anticorpos específicos IgM e IgG, utilizando antígenos já reconhecidos.

A progressão da doença pode explicar a anergia de alguns bovinos infectados aos testes comuns baseados na IMC. A ausência da resposta celular nos animais infectados ocorre em particular quando a carga bacteriana é alta (McNAIR et al., 2000). Na tuberculose humana, a falta de reatividade ao teste cutâneo em alguns indivíduos foi associada a uma ausência dos receptores nos linfócitos (POLLOCK e NEILL, 2002). Denis e colaboradores (2007) formularam a hipótese de que o gado bovino anérgico constitui um grupo de animais no qual o componente antiinflamatório foi recrutado, prevenindo a expressão dos marcadores da imunidade contra a tuberculose, como a resposta ao PPD bovino. Dados recentes, provenientes de um modelo de infecção de tuberculose em bovinos, indicaram que há uma liberação apreciável de IL-10 associada com a progressão da doença, fortalecendo a idéia da participação desta interleucina na anergia ao PPD. A falha no desenvolvimento de uma resposta ao PPD também pode estar vinculada a um perfil melhorado de ativação dos monócitos ou dos macrófagos, em particular pela liberação de altos níveis de nitrogênio reativo e/ou intermediários do oxigênio ou prostaglandinas, reduzindo a proliferação de linfócitos T e/ou a liberação de citocina (DENIS et al., 2007).

A imunização animal não é possível devido ao fato de que não há nenhuma vacina eficaz disponível, além de não possuir aplicação no contexto de um programa nacional baseado no teste e abate dos animais reativos. Nos seres humanos a imunização contra as infecções micobacterianas patogênicas é realizada utilizando *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) (SANTUOSSO et al., 2006; LIN et al., 2007; SAMPERIO et al., 2008), um isolado atenuado de *Mycobacterium bovis* obtido pela passagem *in vitro* de 1908 a 1921 (BELLEY et al., 2004), originalmente derivado de

uma vaca com mastite tuberculosa (ALDWELL et al., 2003). Embora a vacina seja usada amplamente, a eficácia do BCG é variável (BUDDLE et al., 2005; MUSTAFA et al., 2006; JARON et al., 2008), e mostrou não poder proteger eficientemente contra a tuberculose pulmonar adulta nas zonas endêmicas (JARON et al., 2008).

2.9 DIAGNÓSTICO

2.9.1 Métodos Diretos - Evidenciação do Agente

2.9.1.1 Exame direto – baciloscopia

Apesar da baciloscopia das amostras ser um método mais rápido e mais barato comparado com outros métodos, a visualização dos BAAR não é capaz de discriminar entre membros da família *Mycobacteriaceae*, ou entre membros do gênero *Mycobacteria* e outros organismos que dividem esta característica tintorial, incluindo espécies de *Legionella*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsolunnurella*, *Cryptosporidium* e *Ciclospora* (EISENSTAFT e HALL, 1995). Além disso, este método carece de sensibilidade (WARDS et al., 1995) e só pode revelar a presença de BAAR quando as concentrações são maiores que 10^4 bactérias por mililitro (RODRIGUEZ et al., 2004). Devido a sua especificidade baixa, que leva a resultados falsos-negativos, associado às dificuldades em se obter esputo dos animais, o exame direto não é empregado rotineiramente como um método de diagnóstico para a tuberculose bovina.

2.9.1.2 Cultivo bacteriológico

As técnicas usadas nos laboratórios veterinários para isolar *M. bovis* diferem das utilizadas nos laboratórios médicos, principalmente porque as cepas de *M. bovis* crescem mal ou não crescem no meio com glicerol usado para o cultivo de *M. tuberculosis*. Por este motivo os meios que contenham piruvato de sódio em vez do glicerol são usados para o isolamento de *M. bovis* (WHO, 1996). Embora seja aceito em geral que as micobactérias cresçam mais rapidamente no meio líquido, tem sido raramente observado que alguns isolados micobacterianos aparecem exclusivamente em meio sólido (SALFINGER e PFYFFER, 1994).

O gênero *Mycobacterium* é altamente exigente com respeito a sua necessidade de nutrientes, enquanto outros microrganismos se multiplicam mais fácil e mais rápido. As amostras coletadas do esputo, do leite ou lesões tissulares suspeitas devem ser submetidas aos métodos de descontaminação para eliminar tais microrganismos competitivos. O pré-tratamento ou descontaminação das amostras é requerida, pelo acréscimo de NaOH, H₂SO₄, HPC, ácido oxálico, ou compostos de amônio quaternário (CORNER, 1994; YOUNG et al., 2005). O efeito tóxico da descontaminação pode afetar a viabilidade micobacteriana, interferindo nos resultados do cultivo (HOLANDA et al., 2002).

O crescimento de *M. bovis* pode durar até oito semanas (WARDS et al., 1995), e em um meio sólido apropriado com piruvato, as colônias são de aspecto liso e de coloração branca. Padrões de crescimento característico e morfologia colonial podem prover um diagnóstico presuntivo de *M. bovis*; no entanto cada cepa isolada precisa ser confirmado (OIE, 2008). A identificação é feita em dois passos, o primeiro deles consiste na obtenção de uma cultura primária do bacilo a partir da amostra; o segundo passo é baseado na identificação do bacilo com base nas características fisiológicas e bioquímicas de uma sub-cultura (THOREL, 1994).

Os ensaios bioquímicos requerem de duas a quatro semanas adicionais depois do crescimento das colônias de micobactérias no meio de cultura (SALFINGER e PFYFFER, 1994). Apesar do isolamento de *M. bovis* ser a comprovação da infecção, a dificuldade de obter amostras representativas dos animais vivos, o tempo gasto com o pré-tratamento, o lento crescimento e o tempo adicional para a identificação bioquímica representam importantes limitações do método.

2.9.2 Métodos Indiretos

2.9.2.1 Testes tuberculínicos intradérmicos

A tuberculinização, ou testes tuberculínicos intradérmicos, são os testes mais utilizados atualmente para diagnosticar a tuberculose no gado bovino, utilizado por mais de 100 anos (MONAGHAN et al., 1994). De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento estes testes são recomendados como diagnóstico oficial no Brasil (BRASIL, 2006). O teste conhecido como teste cervical

simples (TCS) consta da injeção de um derivado protéico purificado (PPD) originário de *M. bovis* (bovPPD). Quando realizado paralelamente à injeção de PPD originária de *M. avium* (avPPD), o teste é conhecido como teste cervical comparativo (TCC). O TCS consiste na injeção intradérmica, no terço médio da região cervical, de 0,1 mL de PPD bovino (cepa AN5 ou Valée). A leitura é conduzida após 72 horas com um cutímetro, com base na avaliação da reação de hipersensibilidade no local da inoculação (WOOD e ROTHEL, 1994). No TCC, a inoculação é realizada com 0,1 mL de ambos os PPDs: bovPPD e avPPD (Amostra D4) via injeção intradérmica, mantendo uma distância de 15 a 20 cm entre ambas as inoculações; sendo o avPPD inoculado cranialmente ao bovPPD. Após 72 horas de inoculação, o animal é considerado positivo quando a reação ao bovPPD é maior que 4,0 mm comparado com a reação ao avPPD (BRASIL, 2006).

Animais infectados por *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *Nocardia farcinus* ou outras micobactérias podem ser reativos ao PPD bovino, conduzindo a resultados falso-positivos. Como as micobactérias possuem diversos antígenos compartilhados, estas reações cruzadas podem ser facilmente esperadas, o que reduz a especificidade do teste. Desta forma, o TCC é realizado com a finalidade de reduzir a ocorrência de tais reações cruzadas; no entanto, até esta metodologia não elimina todas as reações não específicas (COLLINS et al., 1994).

Apesar do amplo uso desta análise, os relatos de sensibilidade da tuberculinização variam de 68-95%, enquanto a especificidade (para TCC) varia de 96-99%. Outra desvantagem a ser considerada poderia ser a necessidade de duas visitas à propriedade em um prazo de 72 horas (MONAGHAN et al., 1994), que gera um diagnóstico mais caro, laborioso e sujeito às fraudes (LILENBAUM et al., 1999b). Com frequência, seu uso como uma única ferramenta para o diagnóstico da tuberculose bovina não detecta todos os animais infectados (LIEBANA et al., 2008), não permitindo a eliminação completa de fontes de infecção do rebanho devido principalmente à ocorrência de animais anérgicos que não reagem aos testes tuberculínicos.

2.9.2.2 Testes com base na imunidade celular

Está bem estabelecido que a resposta imunológica das infecções micobacterianas é predominantemente do tipo mediado por células, pelo menos em seus primeiros estágios. Portanto, as técnicas de diagnóstico devem ser baseadas preferencialmente na medição das respostas dos linfócitos T (WOOD e ROTHEL, 1994). As limitações dos testes tuberculínicos intradérmicos levaram ao desenvolvimento de outros testes de diagnóstico. Wood e colaboradores (1990a) desenvolveram um teste rápido (24 horas) para a tuberculose bovina de análise celular "*in vitro*", baseado na detecção de γ interferon (IFN), que é liberado em resposta a antígenos específicos em uma cultura de sangue total. A produção dos anticorpos monoclonais específicos para IFN- γ permitiu o desenvolvimento do Teste IFN- γ (WOOD et al., 1990b; ROTHEL et al., 1990).

Comparações dos testes a campo demonstraram que este teste é mais sensível que o TCS, variando de 76,7% a 93,2% de sensibilidade (WOOD et al., 1991). IFN também pode identificar animais negativos aos testes tuberculínicos, uma vez que é capaz de detectar animais infectados nas etapas iniciais da infecção (NEILL et al., 1994b; GORMLEY et al., 2006). Cagiola e colaboradores (2004) relataram especificidade maior que a dos testes tuberculínicos intradérmicos, variando de 97,3% a 98,6%. No Brasil, Lilenbaum e colaboradores (1999b) compararam IFN ao teste de tuberculinação intradérmica em condições de campo, e também demonstraram que a sensibilidade do IFN foi maior que a do teste cutâneo.

O uso do IFN requer somente uma manipulação do animal, e uma vez que na estimulação dos linfócitos é realizada "*in vitro*", não é necessário esperar 60 ou 90 dias para repetir o teste, mesmo quando os resultados forem inconclusivos. Na realidade, este teste pode ser repetido quantas vezes forem necessárias, a qualquer intervalo de tempo, uma vez que o animal não é inoculado com PPD (WHIPPLE et al., 1995). A interpretação dos resultados é baseada nos valores numéricos, o que torna este teste mais objetivo que as reações de hipersensibilidade mensuradas na pele do animal.

Adicionalmente ao seu uso como um teste de diagnóstico, Ryan e colaboradores (2000) demonstraram que IFN também poderia ser usado como teste confirmatório quando se aplica em animais sensibilizados até oito dias após a inoculação de PPD. Não há nenhuma diferença significativa nos índices de

sensibilidade e de especificidade do IFN realizado com amostras cultivadas no mesmo dia e 72 horas após o dia da coleção.

As maiores desvantagens do uso do IFN são a necessidade de processar as amostra em laboratórios adequadamente equipados, e o custo unitário do teste que é maior comparado aos testes cutâneos (LILENBAUM et al., 1999a).

2.9.2.3 Análises sorológicas

Está bem estabelecido que o gado bovino infectado por *Mycobacterium bovis* desenvolve como primeira resposta imunológica a imunidade mediada por células (FIFIS et al., 1994b; McNAIR et al., 2001; ALITO et al., 2003; WELSH et al., 2005; POLLOCK et al., 2005), e que os testes sorológicos são menos eficientes para identificar o gado bovino nos primeiros estágios da infecção de tuberculose, quando os níveis de anticorpos são baixos (WOOD e ROTHEL, 1994).

No entanto, há várias vantagens para o uso dos métodos sorológicos como ELISA para o diagnóstico da tuberculose bovina. Esses testes requerem somente uma manipulação dos animais e somente uma visita do veterinário a fazenda. A amostragem sanguínea pode ser repetida com a frequência necessária sem alterar o estado imune do animal. A interpretação é baseada nos valores numéricos e é mais objetiva que a observação da reação de hipersensibilidade na pele do animal (LILENBAUM et al., 2001). A técnica de ELISA indireto mensura a ligação de anticorpos específicos a um antígeno (LILENBAUM et al., 1999a). Para diagnosticar o gado bovino infectado por *Mycobacterium bovis*, os antígenos geralmente empregados são o PPD ou antígenos purificados de *M. bovis* isolados ou associados (LILENBAUM et al., 1999a; LILENBAUM et al., 2001; SILVA, 2001; FIFIS et al., 2004b, WATERS et al., 2006b).

Considerando os antígenos purificados, o complexo Ag85 representa a maior parte das proteínas secretadas (WIKER et al., 1986; WIKER e HARBOE, 1992). Contudo, os anticorpos dirigidos a este antígeno talvez estejam presentes também em indivíduos não infectados (WIKER e HARBOE, 1992), conduzindo a resultados falso-positivos. A proteína MPB70, que representa cerca de 10% do PPD (WIKER e HARBOE, 1992), foi identificada como alvo de células B em gado bovino tuberculoso (LIGHTBODY et al., 2000) e também como uma proteína específica (HARBOE et al., 1986; BILMAN-JACOB et al., 1990; RADFORD et al., 1990). Foi sugerido que a

MPB70 e a proteína altamente homóloga MPB83 estariam envolvidas na ligação de *M. bovis* com proteínas da célula hospedeira (CHAMBERS et al., 2004). MPB70 e MPB83 são proteínas micobacterianas homólogas secretadas com uma limitada distribuição de espécies. Essas proteínas têm atraído muita atenção porque são altamente expressadas por *Mycobacterium bovis* e minimamente expressadas por *Mycobacterium tuberculosis in vitro*, e provavelmente *in vivo* (WIKER et al., 1998).

Wiker e colaboradores (1998) demonstraram o potencial de diagnóstico dessas proteínas, e indicaram que a maioria dos anticorpos monoclonais identificam os determinantes antigênicos compartilhados nessas moléculas, e que os epítomos lineares de MPB70 foram os grandes alvos de anticorpos após a imunização com preparados protéicos e durante a infecção com *M. bovis*. O uso de rM70-83-E6, uma recombinação dos antígenos MPB70, MPB83 e ESAT-6, pode reagir especificamente com soros de bovinos tuberculosos, melhorando a sensibilidade e especificidade do ELISA (LIU et al., 2007).

Há uma possibilidade de que os antígenos recombinantes não sejam antigenicamente idênticos aos antígenos naturalmente produzidos pelas micobactérias naturalmente, e por este motivo, eles não podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico dos animais infectados (FIFIS et al., 1994b). Silva (2001) também informou sobre o aumento da sensibilidade proporcionalmente ao número e a distribuição das lesões encontradas nos exames anatomopatológicos, sugerindo que a sensibilidade de ELISA depende do tempo e da gravidade da infecção do rebanho.

Embora as análises sorológicas não possam ser consideradas como a primeira escolha em método de diagnóstico, muitos pesquisadores descrevem os objetivos estratégicos de seu uso (DE LA RUA-DOMENECH, 2006a; SILVA, 2001; LILENBAUM e FONSECA, 2006). A estratégia é baseada na existência dos animais anérgicos (SILVA, 2001; McNAIR et al., 2001) e no aumento dos anticorpos nas etapas mais avançadas da doença (POLLOCK e NEILL, 2002; WELSH et al. 2005). Lilenbaum e Fonseca (2006) identificaram vacas tuberculosas usando ELISA em 18 rebanhos incluídos em um programa de controle da tuberculose, e confirmaram a infecção mediante o isolamento de *M. bovis* das lesões do pulmão. Neste caso, o ELISA foi empregado como um teste de diagnóstico complementar e melhorou o controle da tuberculose mediante a identificação das vacas anérgicas.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização simultânea de diferentes métodos de diagnóstico da tuberculose bovina em um rebanho naturalmente infectado, a fim de otimizar o diagnóstico da enfermidade em nosso meio.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os diferentes testes de diagnóstico da tuberculose quanto à sensibilidade, especificidade e precocidade no diagnóstico “*in vivo*” a campo;
- 2) Empregar a cultura bacteriana do agente no diagnóstico confirmatório “*post mortem*”;
- 3) Sugerir a adoção de novas estratégias de controle da Tuberculose bovina, baseado nos resultados obtidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

4.1.1 Caracterização do rebanho e testes “in vivo”

Um rebanho leiteiro compreendendo 274 vacas mestiças foi estudado. De acordo com a determinação oficial, todos os animais eram testados regularmente uma vez por ano pelo teste cervical simples (TCS). Para a formação do rebanho, foram adquiridas 32 vacas provenientes de diversos outros rebanhos. Seis meses após a aquisição das mesmas foi realizado o TCS em todos os animais do rebanho. Dentre as 274 vacas, vinte e uma vacas apresentaram reatividade ao teste e foram mantidas em quarentena por 90 dias à espera de testes confirmatórios. Após 90 dias, o teste cervical comparativo (TCC) foi realizado em todos os animais do rebanho. Nesta ocasião as primeiras 21 vacas que foram previamente reativas pelo TCS, foram confirmadas como infectadas além de outras 11 vacas também identificadas como reativas, totalizando 32 vacas reativas aos testes intradérmicos (grupo A).

4.1.2 Seleção dos animais para realização dos testes “in vitro”

Entre os 242 animais negativos aos testes intradérmicos foram selecionadas randomicamente 18 vacas (grupo B) como controle negativo para realização dos testes “in vitro”. As amostras de soro e sangue dos animais do grupo A e do grupo B (totalizando 50 amostras) foram submetidas ao IFN.

4.1.3 Seleção dos animais para abate

Os animais considerados positivos a pelo menos um dos testes empregados (tuberculinização e IFN) e mais cinco animais reativos ao ELISA (dados não mostrados) foram selecionados para o abate para coleta de amostras de tecidos, a fim de realizar a cultura bacteriológica. Por questões econômicas, o proprietário da fazenda não autorizou o abate dos animais considerados negativos nos três métodos de diagnóstico empregados e de seis vacas em estágio final de prenhez, entre elas cinco vacas reativas aos testes tuberculínicos e uma vaca reativa ao ELISA. Desta forma, foram abatidos 34 animais.

4.2 TESTES TUBERCULÍNICOS INTRADÉRMICOS

Os testes tuberculínicos foram realizados de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) em todos os animais do rebanho. O teste cervical simples (TCS) constou da injeção de 0,1 mL de PPD bovino no terço médio da região cervical. A leitura foi conduzida após 72 horas com um cutímetro, com base na avaliação da reação de hipersensibilidade no local da inoculação. No teste cervical comparado (TCC) a inoculação foi realizada com 0,1 mL de ambos os PPDs: bovPPD e avPPD por via intradérmica, mantendo uma distância de 15 a 20 cm entre ambas as inoculações; sendo o avPPD inoculado cranialmente ao bovPPD. Após 72 horas de inoculação, o animal foi considerado positivo quando a reação ao bovPPD foi maior que 4,0 mm comparado com a reação ao avPPD (BRASIL, 2006). A interpretação das reações foi realizada conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil - Laboratório Nacional de Referência Animal.

4.3 TESTES BASEADOS EM RESPOSTA CELULAR (IFN)

As amostras para o IFN foram colhidas dos animais pertencentes aos grupo A e B no dia zero (mesmo dia da inoculação de PPD no animal), em tubos limpos e desengordurados contendo heparina (10 UI/mL; Sigma) e transportadas ao laboratório à temperatura ambiente (aproximadamente 25° C). No sétimo e no 21° dias após a inoculação de PPD (p.i.), novas amostras dos mesmos animais foram

colhidas e transportadas ao laboratório em temperatura ambiente conforme recomendação de Ryan e colaboradores (2000), para avaliação de seu uso como método confirmatório da infecção em animais intradermoreativos

O IFN foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, em dois passos. O primeiro passo consistiu no cultivo de células sanguíneas durante 18 horas sob temperatura de 37 °C em câmara úmida. Nesta etapa, as amostras de sangue foram divididas em três alíquotas, sendo as duas primeiras sensibilizadas com antígenos PPD bovino e PPD aviário para que houvesse a produção de IFN- γ . A terceira alíquota recebeu PBS em substituição ao um dos antígenos sensibilizantes e representou o controle negativo do teste. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e o plasma sobrenadante foi coletado e refrigerado para que, na segunda etapa, a citocina liberada fosse quantificada em um imuno ensaio (ELISA) indireto baseado em anticorpos monoclonais anti- IFN- γ bovino.

.Ainda de acordo com as recomendações do fabricante do teste, foram incluídos controles positivos e negativos em todas as placas para controle. O desempenho do teste foi validado pela absorbância média dos controles positivos e negativos, e a interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Bovigan® – Pfizer, Animal Health, USA).

4.4 PROCESSAMENTO BACTERIOLÓGICO

4.4.1 Processamento das amostras e preparação de esfregaços

Durante a necropsia dos 34 animais previamente selecionados, foram assepticamente colhidos fragmentos de pulmão totalizando 100g, e um fragmento de 50g de linfonodo subescapular de cada animal. O material foi imediatamente congelado e transportado ao laboratório após 48 horas. Para iniciar o processamento das amostras o material congelado era acondicionado em geladeira para o descongelamento durante a noite e mantidos a 4^o-6 °C. Em uma cabine de segurança 15 gramas de tecido de cada animal foram macerados com areia estéril e preparados como uma única amostra. Este material foi suspenso em 15 mL de água destilada estéril. Cada amostra foi homogeneizada e dividida em três partes de 5 mL para os três diferentes protocolos de descontaminação.

Antes de cada protocolo de descontaminação, foram ainda preparados esfregaços com as suspensões dos tecidos de cada animal, posteriormente fixados

e corados por Ziehl-Nielsen para visualização de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) de acordo com as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobacterias do Ministério da Saúde do Brasil (2008).

4.4.2 Descontaminação e cultura bacteriana

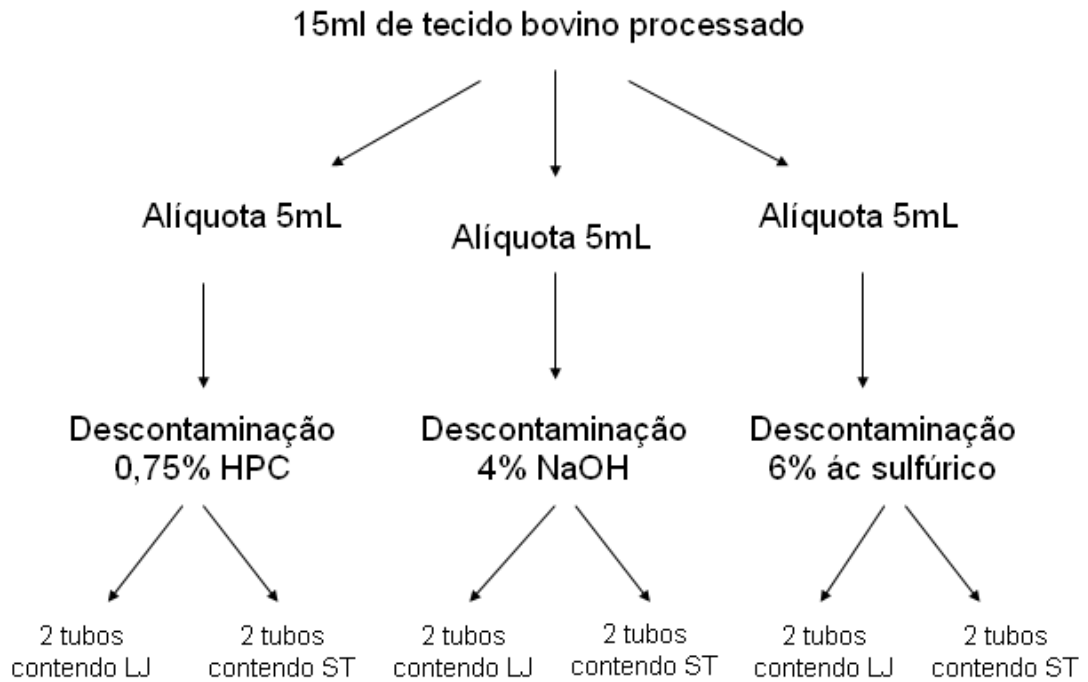
As amostras de cada animal foram divididas em três alíquotas de 5 ml cada. A primeira alíquota foi tratada com 0,75% de cloreto de hexadecylpyridinium (HPC), a segunda com 6% de ácido sulfúrico conforme descrito por Holanda e colaboradores (2007) e a terceira pelo método de Petroff (4% NaOH) (MS, 2008).

Os protocolos da utilização de 0,75% HPC ou 6% ácido sulfúrico foram realizados segundo o seguinte protocolo: Duas alíquotas do tecido macerado com 5 mL cada foram colocadas em dois tubos Falcon de 50mL, sendo adicionados 10 mL de cada descontaminante em cada tubo e deixado-os agir por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a digestão, as suspensões de tecido foram centrifugadas por 15 minutos à 1000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com água destilada estéril por duas vezes., com uma nova centrifugação a cada lavagem. O sedimento foi resuspenso em 2 mL de água destilada estéril.

Resumidamente, o protocolo de Petroff foi realizado da seguinte forma: após a adição de 5 mL de solução de hidróxido de sódio a 4%, as amostras foram agitadas três vezes, com períodos de 10 minutos de descanso entre elas, totalizando um período total de 30 minutos de digestão em temperatura ambiente. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 25 minutos e, em seguida, neutralizadas com uma solução de KH_2PO_4 a 14%. O sobrenadante foi desprezado em um recipiente a prova de respingos e o sedimento resuspendido em 2 mL de água destilada estéril.

Após os referidos protocolos, cada uma das amostras originárias dos três métodos de descontaminação foi submetida a uma mesma seqüência de semeadura em meios apropriados. Para o isolamento, foi inoculado de 0,2 mL de cada alíquota animal por tubo, em dois tubos contendo meio de Lowenstein-Jensen adicionado de piruvato a 0,5% (LJ) e em dois tubos contendo meio de Stonebrink (ST) (figura 1). A suspensão restante foi utilizada para confeccionar novas lâminas para visualização

Figura 1. Seqüência do processamento, descontaminação das amostras provenientes de animais dos grupos A e B e semeadura em meios Lowenstein-Jensen acrescido de piruvato a 0,5% e Stonebrink.



de BAAR e o restante armazenado para estudos posteriores. As culturas foram incubadas a 37 ° C e observadas semanalmente durante doze semanas.

4.4.3 Identificação bacteriana

As colônias sugestivas de *M. bovis* foram submetidas à caracterização molecular, como descrito por Figueiredo e colaboradores (2008). Resumidamente, o DNA micobacteriano foi extraído como descrito anteriormente por Meikle e colaboradores (2007). A PCR multiplex (m-PCR) foi realizada em uma solução de reação (50 µL) contendo 5 µl de tampão (Invitrogen ®), 200 M dNTP (GE Healthcare ®), 2,5 U de Taq polimerase recombinante (Invitrogen ®), 0,2 M de cada primer (Invitrogen ®) JB21 (5'-TCGTCCGCTGATGCAAGTGC-3') e JB22 (5'-CGTCCGCTGACCTC AAGAAAG-3') (Rodríguez et al., 1999) e INS1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3 ') e INS2 (5'-GCGTAGGGCGTCGGTGACAAA - 3 ') (10), 2,0 mM MgCl₂, e 5 µL de DNA purificado modelo. A amplificação foi realizada em um termociclador modelo GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems ®) seguindo os seguintes parâmetros: 94 ° C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 ° C, 1 min a 68 ° C e 1 min a 72 ° C, com uma extensão final a 72 ° C por 7 min. Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (10 mg / mL). As amostras negativas foram analisadas por "PCR-restriction analysis" (PRA), utilizando primers Tb11 (5'-ACCAA CGATGGTGTGTCCA T-3 ') e Tb12 (5'-CTTGTGCGAACC GCATACCCT-3') com o gene *hsp65* como alvo (Telenti et al., 1993). Os produtos amplificados foram digeridos com *BstE* II e *Hae*III e os fragmentos resultantes foram fracionados por eletroforese em gel e agarose corados com brometo de etídio.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A eficiência dos métodos foi avaliada pelo cálculo da sensibilidade e especificidade de cada método testado, segundo Galen & Gambino (1975), considerando como padrão resultados positivos no TCC em conjunto com a cultura bacteriana confirmada pela PCR. A linha de corte (*cut-off*) de cada teste foi escolhida como sendo o valor que permitiu a divisão mais acurada entre os soros positivos e negativos. A correlação entre os testes, juntamente com seus valores de

sensibilidade, foi comparada pelo cálculo do índice de correlação k (índice Kappa). A avaliação das diferenças entre dos métodos de descontaminação empregados foi realizada pelo teste qui-quadrado (χ^2).

5 RESULTADOS

5.1 TESTES TUBERCULÍNICOS INTRADÉRMICOS

Dentre as 274 vacas do rebanho estudado, 21 vacas apresentaram reatividade ao primeiro TCS e foram mantidas em quarentena por 90 dias à espera de testes confirmatórios. Após 90 dias, TCC foi realizado em todos os animais do rebanho, e as 21 vacas que foram previamente reativas foram confirmadas como infectadas, além de mais 11 vacas que foram reativas, totalizando 32 vacas reativas aos testes intradérmicos (tabela 1).

5.2 DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTA IMUNE DO TIPO CELULAR (IFN)

5.2.1 Dia Zero - momento da inoculação com PPD

IFN foi empregado em 50 vacas de dois grupos (A e B), conforme descrito anteriormente. Neste momento, o teste diagnosticou como positivas 33 vacas, sendo 30 pertencentes ao Grupo A e três do Grupo B. Em ambos os grupos, houve um animal cujo sangue não foi analisado pelo teste (tabela 2). Do total de animais infectados, conforme os padrões estabelecidos, foram corretamente identificados como reativos 31 animais, enquanto as restantes duas vacas foram interpretadas como reações falso-positivas, por não atenderem aos padrões estabelecidos neste estudo.

Tabela 1: Resultados do Teste Cervical Simples (TCS) e Teste Cervical Comparado (TCC) dos animais do grupo A (cor amarela) e grupo B (cor azul).

Nº animal	TCS ago/06	TCC 07/11	Nº animal	TCS ago/06	TCC 07/11	Nº animal	TCS ago/06	TCC 07/11
3	Negativo	Negativo	370	Reativo	Reativo	175	Negativo	Reativo
141	Negativo	Negativo	87	Reativo	Reativo	77	Negativo	Reativo
195	Negativo	Negativo	15	Negativo	Reativo	165	Reativo	Reativo
524	Negativo	Negativo	5	Negativo	Reativo	61	Reativo	Reativo
43	Negativo	Negativo	53	Reativo	Reativo	129	Reativo	Reativo
4	Negativo	Negativo	343	Reativo	Reativo	143	Reativo	Reativo
521	Negativo	Negativo	92	Negativo	Reativo	156	Reativo	Reativo
20	Negativo	Negativo	67	Reativo	Reativo	130	Reativo	Reativo
16	Negativo	Negativo	162	Reativo	Reativo	179	Reativo	Reativo
68	Negativo	Negativo	23	Reativo	Reativo	135	Reativo	Reativo
519	Negativo	Negativo	121	Reativo	Reativo	50	Reativo	Reativo
110	Negativo	Negativo	19	Reativo	Reativo	125	Reativo	Reativo
65	Negativo	Negativo	80	Negativo	Reativo	11	Reativo	Reativo
198	Negativo	Negativo	22	Negativo	Reativo	6	Reativo	Reativo
70	Negativo	Negativo	25	Negativo	Reativo			
197	Negativo	Negativo	46	Negativo	Reativo			
139	Negativo	Negativo	35	Negativo	Reativo			
185	Negativo	Negativo	181	Negativo	Reativo			

Tabela 2: Resultados dos Testes de Interferon- γ (IFN) realizados nos dias zero, sete e 21 p.i. nos animais do grupo A (cor amarela) e grupo B (cor azul).

Nº	IFN dia zero	IFN dia sete	IFN dia 21
3	Negativo	Negativo	Negativo
141	Negativo	Negativo	Negativo
195	Negativo	Negativo	Negativo
524	Negativo	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
521	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Não testado
16	Negativo	Negativo	Negativo
68	Negativo	Negativo	Negativo
519	Negativo	Negativo	Reativo
110	Negativo	Negativo	Negativo
65	Negativo	Negativo	Negativo
198	Negativo	Não testado	Negativo
70	Não testado	Negativo	Não testado
197	Reativo	Não testado	Reativo
139	Reativo	Reativo	Reativo
185	Reativo	Reativo	Reativo
370	Negativo	Negativo	Negativo
15	Reativo	Negativo	Negativo
5	Reativo	Negativo	Negativo
53	Não testado	Reativo	Reativo
343	Reativo	Negativo	Negativo
92	Reativo	Negativo	Reativo
67	Reativo	Negativo	Reativo
162	Reativo	Negativo	Reativo
23	Reativo	Reativo	Reativo
121	Reativo	Reativo	Reativo
19	Reativo	Reativo	Negativo
80	Reativo	Reativo	Reativo
22	Reativo	Reativo	Reativo
25	Reativo	Reativo	Reativo
46	Reativo	Reativo	Reativo
35	Reativo	Reativo	Reativo
181	Reativo	Reativo	Reativo
175	Reativo	Reativo	Reativo
77	Reativo	Reativo	Reativo
87	Reativo	Reativo	Reativo
165	Reativo	Reativo	Reativo
61	Reativo	Reativo	Reativo
129	Reativo	Reativo	Reativo
143	Reativo	Reativo	Negativo
156	Reativo	Reativo	Reativo
130	Reativo	Reativo	Reativo
179	Reativo	Reativo	Negativo
135	Reativo	Reativo	Reativo
50	Reativo	Reativo	Negativo
125	Reativo	Reativo	Reativo
11	Reativo	Reativo	Reativo
6	Reativo	Reativo	Reativo

5.2.2 Dia Sete pós inoculação com PPD

Quando realizado com as amostras de sangue coletadas sete dias após a inoculação de PPD, IFN diagnosticou como positivas 27 vacas, sendo 25 do Grupo A e duas do Grupo B. Destas últimas, uma havia apresentado resultado positivo no dia zero e a outra não havia sido testado anteriormente. (tabela 2). Do total de animais infectados, conforme os padrões estabelecidos foram corretamente identificados como reativos 26 animais, enquanto a outra vaca foi interpretada como reação falso-positiva, por não atender aos padrões estabelecidos neste estudo.

5.2.3 Dia 21 pós inoculação com PPD

Dentre as amostras coletadas 21 dias após a inoculação de PPD, foram diagnosticadas como positivas 28 vacas, sendo 24 do Grupo A e quatro do Grupo B, as mesmas três que haviam sido diagnosticadas como positivas a este teste no dia zero e mais uma vaca que não foi diagnosticada como positiva em nenhum outro momento (tabela 2). Do total de animais infectados, conforme os padrões estabelecidos, foram corretamente identificados como reativos 25 animais, enquanto as restantes três vacas foram interpretadas como reações falso-positivas, por não atenderem aos padrões estabelecidos neste estudo.

5.2.4 Análise estatística

Conforme previamente estabelecido, para análise estatística foram considerados como infectados os animais cujos resultados foram positivos em um dos seguintes testes: TCC ou cultura bacteriológica. Perante estes padrões, a sensibilidade do IFN no momento da inoculação com PPD foi de 96,8%, enquanto a especificidade foi de 88,8%. Quando este teste foi aplicado sete ou 21 dias após a inoculação do PPD, a sensibilidade foi respectivamente de 78,8% e 75,8%, enquanto a especificidade foi de 94,1% e 84,2%. O teste Kappa foi aplicado e demonstrou que os resultados dos testes nos três momentos são comparáveis entre si. Como ferramenta confirmatória de diagnóstico foi observada uma leve tendência

a melhores resultados tenha sido observada nos resultados do dia sete p.i. em relação ao dia 21 p.i.

5.3 PROCESSAMENTO BACTERIOLÓGICO

5.3.1 Bacterioscopia

Uma vez que, após a leitura das lâminas por três técnicos experimentados, não se evidenciou BAAR nos esfregaços, as amostras foram classificadas como paucibacilares.

5.3.2 Cultura bacteriana

Os fragmentos de linfonodos subescapulares e de pulmão dos 34 animais abatidos foram processados como uma única amostra por animal, totalizando 34 amostras. Para a descontaminação do material suspeito, antes de cultura e isolamento do *M. bovis*, três diferentes metodologias foram realizadas com os seguintes descontaminantes: 0,75% HPC, 6% de ácido sulfúrico e 4% NaOH. Apesar das diferentes abordagens utilizadas, colônias suspeitas de *M. bovis* foram recuperadas apenas de 16 das 34 amostras (tabela 3). Considerando o TCC e as culturas confirmadas como *M. bovis* por PCR, os três métodos de descontaminação em conjunto apresentaram uma sensibilidade de 55,1%. A especificidade não pode ser calculada, pois os animais negativos ao TCC não foram abatidos.

O método que empregou 4% NaOH - Petroff foi capaz de recuperar *M. bovis* a partir de seis amostras. A descontaminação com 0,75% HPC recuperou *M. bovis* de onze amostras, e a descontaminação com 6% de ácido sulfúrico foi capaz de recuperar *M. bovis* de seis amostras. Isoladamente, as sensibilidades dos métodos de descontaminação foram respectivamente 20,6%, 37,9% e 20,6%. O teste qui-quadrado foi aplicado e demonstrou que não houve diferença significativa entre os métodos de descontaminação ($\chi^2 = 0,69$), embora o método que empregou HPC tenha se mostrado mais sensível do que os outros dois. Detalhando os resultados de cada método, seis amostras foram recuperadas somente pelo método HPC, quatro amostras foram recuperadas somente pelo método 6% de ácido sulfúrico, e uma foi recuperada somente pelo método de 4% NaOH. Apenas dois isolados foram

recuperados a partir de amostras tratadas pelas três diferentes metodologias. Os resultados foram representados no diagrama de Venn (figura 2).

5.3.3 Identificação bacteriana

De acordo com a caracterização molecular, 14 das 16 amostras de colônias recuperadas foram identificadas como *M. bovis* (tabela 3) (Figueiredo et al., 2008). Levando em consideração os resultados de PCR, *M.bovis* foi isolado a partir de 14 das 34 amostras.

Figura 2: Diagrama de Venn: Recuperação de colônias de *Mycobacterium bovis* de tecido bovino de 34 amostras provenientes de animais dos grupos A e B utilizando três métodos de descontaminação.

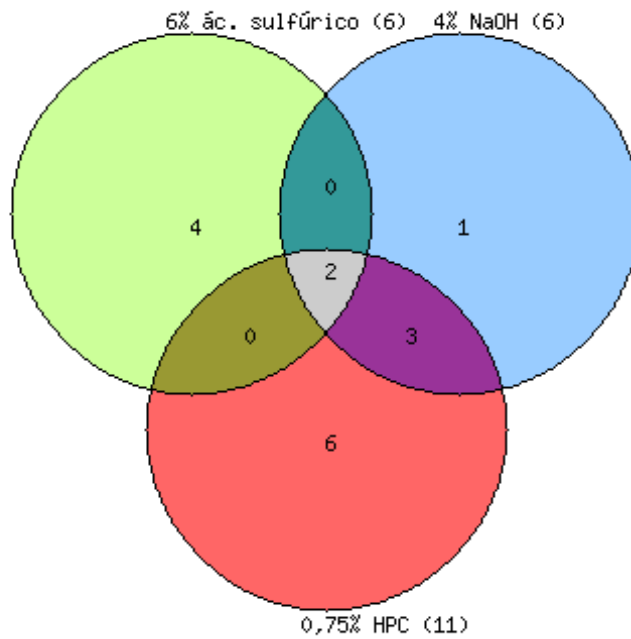


Tabela 3: Confirmação molecular das colônias de *Mycobacterium bovis* isoladas de 34 amostras de tecidos bovinos provenientes de animais dos grupos A (reativos) e B (controle).

Nº amostra	Cultura	m-PCR de Cultura
185	Positivo	Positivo
16	Positivo	Positivo
53	Positivo	Positivo
370	Positivo	Negativo
92	Positivo	Positivo
67	Positivo	Positivo
162	Positivo	Positivo
61	Positivo	Positivo
135	Positivo	Negativo
5	Positivo	Positivo
181	Positivo	Positivo
11	Positivo	Positivo
25	Positivo	Positivo
129	Positivo	Positivo
143	Positivo	Positivo
156	Positivo	Positivo

6 DISCUSSÃO

A tuberculose bovina, causada por *Mycobacterium bovis*, é considerada um problema econômico além de reconhecidamente ser um problema de saúde pública. Para o diagnóstico desta enfermidade são utilizados testes tuberculínicos intradérmicos, baseados na reação de hipersensibilidade tardia, utilizando PPD preparado com o filtrado da cultura de *M. bovis* (THOEN et al., 2006). No entanto, estes testes apresentam uma eficácia variada (MONHAGAN et al., 1994, LIEBANA et al., 2008) resultando na incapacidade de detectar todos os animais infectados, o que contribui significativamente para a persistência da doença em determinados rebanhos (GORMLEY et al., 2006). Este fato pode estar relacionado a diferentes condições imunológicas apresentadas pelos animais infectados, o que resultaria em diferenças na sensibilidade e especificidade dos testes de acordo com cada animal testado. Em casos de animais recentemente infectados ou em estágio avançado de infecção podem ocorrer resultados falso-negativos ou inconclusivos.

De acordo com o PNCEBT, em caso de resultados inconclusivos, pelo menos 60 dias são necessários para que os testes intradérmicos de tuberculinização sejam repetidos. Durante este período, os animais suspeitos devem ser mantidos em quarentena, aumentando o risco de propagação da doença, não só para outros animais, como também para as pessoas que trabalham na fazenda.

No presente estudo, 90 dias após a realização do TIC nos animais da fazenda, o TCC confirmou como infectadas as 21 vacas que haviam sido previamente reativas ao TCS, além de outras 11 vacas reativas. Este fato sugere que as medidas de quarentena podem não ter sido eficazes, ocorrendo a propagação da infecção para outros animais deste mesmo rebanho. Outra possibilidade seria que estes 11 animais estivessem recentemente infectados no momento do primeiro TCS e por isso, não haviam desenvolvido resposta imune

detectável pelo teste tuberculínico empregado. Além destas suposições, existe o fato de que o TCS normalmente possui uma sensibilidade inferior ao TCC (MONAGHAN et al., 1994), situação que justifica a ocorrência de um maior número de animais falso negativos. Neste caso, as 11 vacas consideradas negativas ao TCS e positivas ao TCC já estariam infectadas, excluindo o manejo mal executado dos animais em quarentena como fator determinante para dispersão da doença.

De um modo geral, a sensibilidade e especificidade do TCC é alta, apesar dos estudos empregados avaliarem um número relativamente pequeno de animais, porém mesmo quando testes intradérmicos comparativos são empregados como primeira escolha, resultados falso-positivos ainda podem ocorrer (MONAGHAN et al., 1994, COLLINS et al., 1994), o que reduz a confiabilidade do diagnóstico.

No presente estudo, o status do rebanho infectado foi inquestionável, uma vez que os animais foram diagnosticados pelos testes tuberculínicos intradérmicos, por IFN e ainda houve o isolamento de *M. bovis* em cultura pura com confirmação por PCR específica. Porém este tipo de confirmação do status do rebanho com o isolamento do agente só é possível após o abate dos animais reativos. Neste caso o proprietário possui duas opções, o abate imediato ou a quarenta dos animais a espera de testes confirmatórios, gerando um transtorno na rotina da propriedade e uma perda econômica considerável, uma vez que há o gasto na manutenção destes animais sem o aproveitamento da produção. Normalmente o proprietário opta pela segunda opção, principalmente quando se trata de animais com um alto valor zootécnico. Uma vez que o abate de vacas reativas aos testes tuberculínicos é obrigatório, existe a necessidade de um teste confirmatório confiável que poderia reduzir o tempo entre o primeiro teste e o abate dos animais infectados. Além disso, este teste seria também útil, a fim de evitar o abate desnecessário de animais não infectados.

O uso de IFN em animais previamente sensibilizados com PPD foi sugerido por Ryan e colaboradores (2000) como uma ferramenta complementar, podendo ser utilizado com o objetivo de confirmar ou descartar os resultados dos testes tuberculínicos. Naquele estudo, o teste demonstrou sensibilidade de 85% e especificidade de 93% quando empregado de oito a 28 dias após os testes tuberculínicos intradérmicos. Após esse estudo, IFN foi aprovado na Nova Zelândia, com esta proposta, no período de sete a 30 dias após o teste da prega caudal, reduzindo a duração da restrição de movimentação de mais de metade dos animais,

e também do risco de propagação da infecção (WOOD & JONES, 2001). Entretanto outros estudos reportaram o efeito negativo da tuberculinização nos resultados de IFN durante um período de até 60 dias após os testes tuberculínicos (ROTHEL et al., 1992; WOOD e ROTHEL, 1994). Pesquisas mais recentes não encontraram um impacto significativo na interpretação deste teste quando os animais são previamente submetidos aos testes tuberculínicos (DOHERTY et al., 1995; THOM et al., 2004; GORMLEY et al., 2004). Estas diferenças nos resultados podem ser devido as condições variadas nas quais os estudos foram conduzidos (PALMER et al., 2006), diferentes estágios de infecção dos animais, variação do número de animais selecionados para os estudos e diferentes protocolos de interpretação dos testes (GORMLEY et al., 2006).

Quando utilizado como diagnóstico confirmatório, IFN apresentou no rebanho estudado sensibilidade de 78,8% e 75,8%, enquanto a especificidade foi de 94,1% e 84,2%. Embora a especificidade do teste não tenha sido suficientemente elevada, os resultados são encorajadores. Alguns aspectos devem ser considerados nos resultados observados. Das 16 vacas que foram consideradas como não infectadas segundo os critérios utilizados para análise dos resultados neste estudo (TCC e cultura / PCR), duas delas (vacas de número 139 e 197) foram reativas para os três testes IFN- γ (dias zero, sete pi e 21 pi), embora negativas para TCC, cultura e PCR. De acordo com o conhecimento sobre IFN, não é impossível que estas vacas estivessem nas fases iniciais da doença, sendo diagnosticadas somente por este teste. Deve-se ter em mente que uma vaca que também apresentava reação positiva aos três testes IFN (dias zero, sete pi e 21 pi), embora negativa para o TCC, foi confirmada como infectada por cultura e PCR (vaca n. 185, Tabela 3). Já foi demonstrado que IFN é capaz de detectar a tuberculose bovina de 90 a 150 dias antes do animal se tornar reativo aos testes intradérmicos (LILENBAUM et al., 1999), sendo capaz de detectar a infecção por *M. bovis* em bovinos apenas 14 dias após a inoculação do agente (BUDDLE et al, 1995). Do mesmo modo, Scacchia e colaboradores (2000) constataram que 34% dos animais com resultados positivos ao IFN e negativos ao teste intradérmico obtiveram cultura positiva para *M. bovis*. Presumindo que os dois animais deste estudo com resultados positivos ao IFN e cultura negativa estivessem recentemente infectados, a especificidade do IFN seria de 100% no dia sete p.i. e 92,3% no dia 21p.i.. Tais resultados sugerem que este teste poderia ser aplicado com confiança como uma ferramenta complementar em

bovinos considerados suspeitos nos testes alérgicos cutâneos. Este resultado é concordante com os achados de Cagiola e colaboradores (2004) que relataram especificidade do IFN maior do que a dos testes tuberculínicos intradérmicos, variando de 97,3% a 98,6%.

IFN tem sido extensivamente avaliado como um instrumento de diagnóstico da tuberculose bovina, sendo mais sensível e precoce do que os testes tuberculínicos intradérmicos (LILENBAUM et al., 1999; SCACHIA et al., 2000; WOOD e JONES, 2001). De fato este teste foi essencial no alcance da erradicação da tuberculose bovina na Austrália e seu uso como ferramenta diagnóstica é preconizado (WOOD e JONES, 2001). Neste estudo o teste, considerando os resultados do dia zero, quando foi testado como um instrumento de diagnóstico, obteve sensibilidade de 96,8%, concordando com os resultados dos testes tuberculínicos. No Brasil, Lilenbaum e colaboradores (1999b) compararam IFN ao teste de tuberculinização intradérmica em condições de campo, e também demonstraram que a sensibilidade do IFN foi maior que a do teste cutâneo.

Devido ao seu elevado custo, o teste tem sido recomendado como uma ferramenta complementar ao teste tuberculínico e é destinada principalmente a rebanhos que apresentam alto risco de conterem animais infectados (GORMLEY et al., 2006). Este ensaio é particularmente útil na detecção de bovinos durante a fase inicial da resposta celular, o que ocorre em infecções recentes (POLLOCK et al., 2005).

Levando em consideração os dados apresentados, IFN poderia ser utilizado como um teste confirmatório em animais sensibilizados pelos testes tuberculínicos intradérmicos sete ou 21 dias após a inoculação do PPD, com uma ligeira diferença favorecendo o dia sete pi. Esse teste pode ser aplicado em vacas com resultados inconclusivos nos testes intradérmicos ou nos casos em que uma confirmação da infecção é necessária, dispensando os 60 dias de quarentena e minimizando a propagação da doença, o que aumenta o programa de controle da tuberculose bovina.

No que se refere aos resultados de cultura bacteriológica, as 34 amostras foram processadas por três diferentes metodologias para a descontaminação do material suspeito, pois as micobactérias compõem um grupo de microorganismos com necessidades muito específicas de crescimento em cultura laboratorial. Uma amostra não descontaminada corretamente beneficiaria o crescimento de diversas

outras bactérias nas mesmas condições. Este é um dos principais problemas da cultura e isolamento de *M.bovis*. Porém os métodos empregados são tóxicos também para as células micobacterianas (CORNER, 1994), podendo inviabilizá-las diminuindo assim a possibilidade de isolamento.

Sabe-se que nas últimas fases de uma campanha de erradicação, quando os bovinos são regularmente testados e imediatamente abatidos após uma reação positiva, o mais provável é que os animais identificados sejam recentemente infectados, o que leva á lesões com baixo número de bacilos e conseqüente baixa sensibilidade do isolamento primário (CORNER, 1994).

O rebanho estudado era testado regularmente uma vez por ano pelo TCS, e na análise microscópica do material das lesões não foi observado nenhum BAAR, o que reforça a hipótese de que tais animais eram recentemente infectados e com lesões paucibacilares.

O exame direto (baciloscopia) não é normalmente utilizado como um método diagnóstico da tuberculose bovina. Devido à baixa sensibilidade (WARDS et al., 1995), resultados falso-negativos podem ocorrer. Além disso, este exame não é capaz de discriminar entre os membros da família *Mycobacteriaceae*, ou entre os membros do gênero *Mycobacteria* e outros organismos que partilham desta característica tintorial (EISENSTADT e HALL, 1995). Portanto o exame direto foi utilizado apenas como a primeira etapa do processo de isolamento bacteriano, sugerindo apenas que as amostras fossem paucibacilares.

As amostras foram cultivadas após tratamento com soluções contendo 4% NaOH, 6% ácido sulfúrico e 0,75% HPC. Analisando individualmente os métodos empregados a sensibilidade observada foi considerada baixa. O método de descontaminação por 0,75% HPC apresentou o melhor resultado quando comparado estatisticamente com os outros métodos empregados, apresentando sensibilidade de 37,9%. Apesar das três metodologias utilizadas, a sensibilidade dos métodos em conjunto foi de apenas 55,1%. Este fato pode ser justificado pelo efeito tóxico da descontaminação, que pode afetar a viabilidade das micobacterias, levando á perda de até 10^4 células micobacterianas quando da digestão alcalina (CORNER e TRAJSMATMAN, 1988) interferindo sobre os resultados do cultivo (HOLANDA et al, 2002), e para amostras paucibacilares a presente conseqüência pode ser mais evidente.

O resultado apresentado pela descontaminação por HPC está em concordância com os estudos de Corner e Trajmatman (1988) e Corner (1994), que descreveram as vantagens da utilização deste método. Esta metodologia foi considerada menos agressiva ao agente ao *M. bovis*, aumentando a taxa de isolamento destas bactérias, quando comparados aos outros dois métodos empregados. Possivelmente este fator pode estar associado ao mecanismo de ação do agente já que diferentes substâncias utilizadas para a descontaminação apresentam diferentes características bioquímicas. O método do ácido sulfúrico é baseado na digestão ácida do material, enquanto que o método de Petroff, baseado em NaOH, têm propriedades alcalinas e HPC apresenta propriedades detergentes.

A variabilidade genética de micobactérias também pode interferir nos processos de descontaminação. Foi demonstrado que cepas resistentes aos antibióticos podem ser mais suscetíveis a agentes alcalinos (YESIKAYA et al, 2004; PATRICIA et al, 2005), o que mostra que a variabilidade genética das estirpes pode estar relacionada à sua sensibilidade também aos métodos de descontaminação mais apropriados. Este fato poderia explicar as diferenças no padrão de recuperação de cada método de descontaminação no presente estudo. As colônias de *M. bovis* recuperadas eram provenientes de tecidos com as mesmas características, porém dentre os 34 animais abatidos, 14 haviam sido recentemente adquiridos, oriundos de diferentes rebanhos. A existência de animais infectados provenientes de diferentes rebanhos sugere a presença de diferentes cepas de *M. bovis* envolvidas na ocorrência deste surto de tuberculose bovina.

O padrão de descontaminação das amostras destes animais também sugere a existência de diversas linhagens, já que dentre as cinco amostras recuperadas somente pelo método HPC, duas eram provenientes de animais de outros rebanhos. Entre as quatro amostras recuperadas somente pelo método de descontaminação ácida duas também eram provenientes de animais de outros rebanhos. À medida que a infecção pode ser determinada por diferentes cepas, colônias isoladas no presente estudo podem apresentar diferentes padrões de características fenotípicas, tais como maior suscetibilidade à descontaminação alcalina ou ácida. Este fato justifica os diferentes padrões de descontaminação de cada método, já que determinados grupos de amostras foram recuperadas somente por um método empregado e somente duas amostras foram recuperadas pelos três (figura 2). De acordo com esta observação dois diferentes procedimentos de descontaminação

poderiam tratar uma única amostra, subdividida em menores alíquotas. Isto poderia contribuir para aumentar o isolamento da *M.bovis* no período esperado de 60 dias de cultivo, principalmente quando as concentrações de *M. bovis* são baixas e existe a suspeita de diferentes fontes de infecção.

Existe a necessidade da realização da cultura de lesões suspeitas de tuberculose bovina principalmente quando a prevalência da doença é baixa, a fim de se obter um diagnóstico definitivo e inquestionável do rebanho. Desta forma, o uso do método de decontaminação pelo 0,75% HPC, isoladamente ou em combinação com o método de 6% de ácido sulfúrico para isolamento o primário, é sugerido com o objetivo de aumentar o número de isolados de *M.bovis* em lesões paucibacilares.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados do presente estudo, é possível concluir que:

1. O teste do Interferon γ pode ser utilizado como um teste confirmatório em animais sensibilizados pelos testes tuberculínicos intradérmicos sete ou 21 dias após a inoculação do PPD, com uma ligeira diferença favorecendo o dia 7pi, dispensando os 60 dias de quarentena e minimizando a propagação da doença.
2. Amostras provenientes de propriedades nas quais há a suspeita de diferentes fontes de infecção devem ser submetidas a diferentes procedimentos de descontaminação considerando as especificidades bioquímicas dos agentes descontaminantes.
3. Com o objetivo de aumentar o número de isolados de *M.bovis* em lesões paucibacilares no isolamento primário recomenda-se o uso do método de descontaminação pelo 0,75% HPC, isoladamente ou em combinação com o método de 6% de ácido sulfúrico.

8 OBRAS CITADAS

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 outras doenças ao homem: Um problema de saúde pública (Meat and milk black market - Bovine tuberculosis). *Arch. Med. Vet.* v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ALDWELL, F.E.; TUCKER, I.G.; LISLE, G.W.; BUDDLE, B.M.: Oral Delivery of *Mycobacterium bovis* BCG in a Lipid Formulation Induces Resistance to Pulmonary Tuberculosis in Mice. *Infect Immun.* January; 71(1): 101–108, 2003.

ALITO, A.; MCNAIR, J.; GIRVIN, R.M.; ZUMARRAGA, M.; BIGI, F.; POLLOCK, J.M.; CATALDI, A.. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 1523-1531, 2003.

AMENI, G.; ASEFFA, A.; ENGERS, H.; YOUNG, D.; GORDON, S.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. High Prevalence and Increased Severity of Pathology of Bovine Tuberculosis in Holsteins Compared to Zebu Breeds Under Field Cattle Husbandry in Central Ethiopia. *Clin. Vaccine Immunol.*, p. 1356-1361, Oct. 2007.

ANONYMOUS. A Guide to Johne's Disease in Australia. Natl. *Johne's Dis. Program.* Australian Animal Healthy Council, 2001.

APHIS, Fact Sheet, Veterinary Services, August, 2002
http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fsheet_faq_notice/fs_ahtb.html. Consultado novembro 2008.

BAI, X.; WILSON, S.E.; CHMURA, K.; FELDMAN, N.E.; CHAN, E.D. Morphometric analysis of Th₁ and Th₂ cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, Volume 84, Issue 6, Pages 375-385, 2004.

BAPTISTA, F; MOREIRA, E. C; SANTOS, W. L. M; NAVEDA, L. A. B Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais/ Prevalence of tuberculosis among bovines slaughtered in Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*; 56(5): 577-580, out. 2004.

BELISLE, J.T.; VISSA, V.D.; SIEVERT, T.; TAKAYAMA, K.; BRENNAN, P.J.; BESRA, G.S. ROLE of the Major Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in Cell Wall Biogenesis. *Science*, Vol.276, 30 May 1997.

BELLEY, A.; ALEXANDER, D.; DI PIETRANTONIO, T.; GIRARD, M.; JONES, J.; SCHURR, E.; LIU, J.; SHERMAN, D.R.; BEHR, M.A. Impact of Methoxymycolic Acid Production by *Mycobacterium bovis* BCG Vaccines. *Infect Immun*. 72(5): 2803–2809, May; 2004.

BHAKTA, S.; BESRA, G.S.; UPTON, A.M.; PARISH, T.; VERNON, C.S.; GIBSON, K. J.C.; KNUTTON, S.; GORDON, S.; SILVA, R.P.; ANDERTON, M.C.; SIM, E. Arylamine *N*-Acetyltransferase Is Required for Synthesis of Mycolic Acids and Complex Lipids in *Mycobacterium bovis* BCG and Represents a Novel Drug Target. *J Exp Med*. 3; 199(9): 1191–1199. May, 2004.

BILLMAN-JACOB, H.; RADFORD, A.J.; ROTHEL, J.S.; WOOD, P.R. Mapping of the T and B cell epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein, MPB 70. *Immunol. Cell Biol*. 68, 359-365, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)* /

organizadores, Vera Cecilia Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. - Brasília : MAPA/SDA/DSA, 2006.

BUDDLE, B.M.; SKINNER, M.A.; WEDLOCK, D.N.; COLLINS, D.M.; LISLIE, G.W. New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87 177-185, 2002.

BUDDLE, B.M.; WEDLOCK, D.N.; DENIS, M.; SKINNER, M.A.. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 45-51, 2005.

CAGIOLA, M.; FELIZIANI, F.; SEVERI, G.; PASQUALI, P.; RUTILI, D., Analysis of Possible Factors Affecting the Specificity of the Gamma Interferon Test in Tuberculosis-Free Cattle Herds. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, p. 952-956, Sept. 2004.

CASILLAS, C.R.; ELIZONDO, G.V. ; DIAZ, C.A. Comparación del ELISA con la tuberculinización en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Tec. Pec. Mexico*, v.33, p.148-158, 1995.

CHAMBERS, M.A.; GAVIER-WIDÉN, D.; HEWINSON, R.G. Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Volume 41, Issue 2, Pages 93-100, June 2004.

CHEN, J.M.; ALEXANDER, D.C.; BEHR, M.A.; LIU, J. *Mycobacterium bovis* BCG Vaccines Exhibit Defects in Alanine and Serine Catabolism. *Infect. Immun.* February; 71(2): 708–716, 2003.

COLLINS, D.M.; RADFORD, A.J.; DE LISLE, G.W.; JACOB, H.B.. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet. Microbiol.* 40, 83-94, 1994.

COLLINS, F.M. The immune response to mycobacterial infection: Development of new vaccines. *Vet. Microbiol.* 40, 95-110, 1994.

CORNER, L. A. & TRAJSTMAN A. C. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet. Microbiol.*, Volume 18, Issue 2, Pages 127-134, October 1988.

CORNER, L.A. Post-mortem diagnosis of *M. bovis* infection on cattle. *Vet. Microbiol.*, v.40, n.1-2, p.53-63, 1994.

CORNER, L.A.; MELVILLE, L.; MCCUBBIN, K.; SMALL, K.J.; MCCORMICK, B.S.; ROTHEL, J.S.. Efficiency of inspection procedures for detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust. Vet. J.*, Vol.67, n°11, November, 1990.

CORNER, L.A.L.; COSTELLO, E.; LESELLIER, S.; O'MEARA, D.; GORMLEY, E. Experimental tuberculosis in the European badger (*Meles meles*) after endobronchial inoculation with *Mycobacterium bovis*: II. Progression of infection. *Res. Vet. Sci.*, Volume 85, Issue 3, Pages 481-490, December 2008 b.

CORNER, L.A.L.; COSTELLO, E.; LESELLIER, S.; O'MEARA, D.; GORMLEY, E. Vaccination of European badgers (*Meles meles*) with BCG by the subcutaneous and mucosal routes induces protective immunity against endobronchial challenge with *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, Volume 88, Issue 6, Pages 601-609, November 2008 a.

COSIVI, O.; Grange, J.M.; Daborn, C.J.; Raviglione, M.C.; Fujikura, T.; Cousins, D.; Robinson, R.A.; Huchzermeyer, H.F.A.K.; de Kantor, I.; Meslin, F.X. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries, *Emerg. Infect. Dis.*; Vol. 4 Number1, 1998.

DE LA RUA DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDEMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFON-HADLEY, R.S.. Ante mortem diagnosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.*, 81, 190-210, 2006.

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, Volume 86, Issue 2, Pages 77-109, March 2006.

DENIS, M.; WEDLOCK, D. N.; MCCARTHY, A.R.; PARLANE, N.A.; COCKLE, P.J.; VORDERMEIER, H. M.R.; HEWINSON, G.; BUDDLE B.M. Enhancement of the Sensitivity of the Whole-Blood Gamma Interferon Assay for Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infections in Cattle. *Clin Vaccine Immunol.*; 14(11): 1483–1489, November, 2007.

DOHERTY, M. L.; MONAGHAN, M. L.; BASSETT H. F.; QUINN, P. J. Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis* *Res. Vet. Sci.*, Volume 58, Issue 3, Pages 217-221, May 1995.

DREWE, J.A.; FOOTE A.K.; SUTCLIFFE, R.L.; PEARCE G.P. Pathology of *Mycobacterium bovis* Infection in Wild Meerkats (*Suricata suricatta*) *J. Comp. Pathol.*, Volume 140, Issue 1, Pages 12-24, January 2009.

EISENSTADT, J.; HALL, G.S. Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin. Dermatol.*, Volume 13, Issue 3, Pages 197-206, May-June 1995.

EVANGELISTA, T.B.R. & DE ANDA, J.H. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. Exposure associated with management of colostrum and Milk. *Prev. Vet., Med.* 27 23-27, 1996.

FIFIS, T.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; WOOD, P.R. Cellular and Hummoral Responses of Cattle to Purified *Mycobacterium bovis* Antigens. *Scand. J. Immunol.* 39, 267-274, 1994a.

FIFIS, T.; ROTHEL, J.S.; WOOD, P.R. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.*, 40 65-81, 1994 b.

FIGUEIREDO, E.; SILVESTRE, F.G.; CAMPOS, W.N.; FURLANETTO, L., MEDEIROS, L.; LILENBAUM, W.; FONSECA, L. S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V. Identification of *Mycobacterium bovis* Isolates by a multiplex PCR. Aceito para publicação. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, p.1 - 4, 2008.

FRÁGUAS, S. A. ; CUNHA-ABREU, M. S. ; FERREIRA, A. M. R. ; MARASSI, C. D. ; OELEMAN, W. M. R ; FONSECA, L. S. ; FERREIRA, R. ; LILENBAUM, W. . Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. *Rev. Brás. Ciên. Vet.*, v. 15, p. 117-121, 2008.

FREITAS, J.A.; GUERRA, J.L.; PANETTA, J.C. Características da tuberculose observada em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, vol.38, no.4, p.170-176. ISSN 1413-9596, 2001.

GALEN R.S. & GAMBINO S.R. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. John Wiley & Sons, New York, 1975.

GORMLEY, E.; DOYLE, M.B.; MCGILL, K.; COSTELLO, E.; GOOD, M.; COLLINS, J.D.. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Volume 102, Issue 4, 28, Pages 413-420, December, 2004.

GORMLEY, E.; DOYLE, M.B.; FITZSIMONS, T.; MCGILL, K.; COLLINS, J.D. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet. Microbiol.*, 112, 171-179, 2006.

GRANGE, J.M. & YATES, M.D. Zoonotic aspects of *M.bovis* infection. *Vet. Microbiol.*, v.40, p. 137-51, 1994.

GRANGE, J.M.; YATES, M.D.; KANTOR, I.M. Guidelines for specification within the *Mycobacterium tuberculosis complex*. World Health Organization. 2.ed., 1996. 23p.

GRANGE, J.M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*, Volume 81, Issues 1-2, Pages 71-77, February 2001.

GRANT, I.R.; BALL, H.J.; ROWE, M.T.. Thermal inactivation of several *Mycobacterium spp.* In milk by pasteurization. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22, 253-256, 1996.

GRIFFIN, J.M. & DOLAN, L.A. The role of cattle-to cattle transmission of *Mycobacterium bovis* in the epidemiology of tuberculosis in cattle in the republic of Ireland: A review. *Ir. Vet. J.*, 48: 228-234, 1995.

HAHESY, T.; SCANLON, M.; CARTON, O.T.; QUINN, P.J.; LENEHAN, J.J. Cattle manure and the spread of bovine tuberculosis. *Ir. Vet. J.*, 45: 122-123, 1992 b.

HAHESY, T.; KELLEHER, D.L.; DOHERTY, J. An investigation of a possible association between the occurrence of bovine tuberculosis and weather variable. *Ir. Vet. J.*, 45: 127-128, 1992 a.

HARRINGTON, N.P.; SURUJBALLI, O.P.; WATERS W.R.; Prescott, J.F. Development and Evaluation of a Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Gamma Interferon mRNA To Diagnose Tuberculosis in Multiple Animal Species. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 December; 14(12): 1563–1571. Published online 2007 October 17.

HIRSH, D. & ZEE, Y. *Microbiologia Veterinária*. Guanabara Koogan S.A. Press. Brasil, R.J., 2003.

HOLANDA, E.D.; LOBATO, F.C.; MOTA, P.M.; ABREU, V.L.. Avaliação de Métodos de descontaminação para isolamento de *Mycobacterium bovis*. *R. Bras. Med. Vet.* V.24, nº2, 2002.

JARON, B.; MARANGHI, E.; LECLERC, C.; MAJLESSI, L.. Effect of Attenuation of Treg during BCG Immunization on Anti-Mycobacterial Th1 Responses and Protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*.; 3(7): e2833, 2008.

JUÁREZ, M.D.; TORRES, A.; ESPITIA, C. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* region containing the *mpt83* and *mpt70* genes. *Microbiol. Lett.*, 203: 95-102, 2001.

KANTOR, I.N.; AMBROGGI, M.; POGGI, S.; MORCILLO, N.; TELLES, M.A.S.; RIBEIRO, M.O., TORRES, M.C.G.; POLO, C.L.; RIBÓN, W.; GARCÍA, V.; KUFFO, D.; ASENCIOS, L.; CAMPOS, L.M.V.; RIVAS, C.; WAARD, J.H. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis*, Volume 88, Issue 4, Pages 358-365, July 2008.

KAO, R.R.; GRAVENOR, M.B.; CHARLESTON, B.; HOPE, J.C.; MARTIN, M.; HOWARD, C.J.. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. *J R Soc Interface*. June 22; 4(14): 545–551, 2007.

KATSUBE, T.; MATSUMOTO, S.; TAKATSUKA, M.; OKUYAMA, M.; OZEKI, Y.; NAITO, M.; NISHIUCHI, Y.; FUJIWARA, N.; YOSHIMURA, M.; TSUBOI, T.; TORII, M.; OSHITANI, N.; ARAKAWA, T.; KOBAYASHI, K.. Control of Cell Wall Assembly by a Histone-Like Protein in Mycobacteria. *J Bacteriol*. November; 189(22): 8241–8249, 2007.

KISZEWSKI, A. E.; BECERRIL, E.; AGUILAR, L.D.; KADER, I.T.A.; MYERS, W.; PORTAELS, F.; PANDO, R.H. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin Exp Immunol*. March; 143(3): 445–451, 2006.

LEITE, C.Q.F.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R.A.; ROXO, E.; MORLOCK, G.P.; COOKSEY, R.P. ET AL. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Apr, vol. 98, no.3, p.319-323, 2003.

LESELLIER, S.; CORNER, L.; COSTELLO, E.; SLEEMAN, P.; LYASHCHENKO, K.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; SINGH, M.; HEWINSON, R.G.; CHAMBERS,

M.; GORMLEY, E. Antigen specific immunological responses of badgers (*Meles meles*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Volume 122, Issues 1-2, 15 March, Pages 35-45, 2008.

LIEBANA, E.; JOHNSON, J.; GOUGH, J.; DURR., P.; JAHANS, K.; CLIFTON-HADLEY, R.; SPENCER, Y.; HEWINSON, R.G.; DOWNS, S.H., Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Vet. J.*, 176, 354-360, 2008.

LIGHTBODY, K. A.; MCNAIR, J.; NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle *Vet. Microbiol.*, Volume 75, Issue 2, 31 July , Pages 177-188, 2000.

LILENBAUM, W. ; FONSECA, L. S.; PESSOLANI, M.C.V. . The use of Ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. *J. Vet. Med.*, Series B, Alemanha, v. 48, n. 3, p. 161-166, 2001.

LILENBAUM, W.; MARASSI, C.D.; OELEMANN, W.M.R. Paratuberculosis: An Update. *Braz. J. Microbiol.*, 38:580-590, 2007.

LILENBAUM, W.; SCHETTINI, J.C.; FERREIRA, M.A.S.; SOUZA, G.N.; RIBEIRO, E.R.; MOREIRA, E.C.; FONSECA, L.S. Evaluation of an ELISA - PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Res. Vet. Sci.*, v. 66, p. 191-195, 1999 a.

LILENBAUM, W. ; SCHETTINI, J. ; SOUZA, G. N. ; RIBEIRO, E. R. ; MOREIRA, E. C. . Comparison between a gamma- IFN assay kit and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis on field trials in Brazil. *J. Vet. Med.*, Series B, v. 46, n. 5, p. 353-358, 1999 b.

LILENBAUM, W.; SCHETTINNI, J.; SOUZA, G.N.; RIBEIRO, E.R.; MOREIRA, E.C.; FONSECA, L. Tuberculose Bovina: Prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na região dos lagos do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Brás. Med. Vet.*, v.20, n.3, p.120-123, 1998.

LIN, M.Y.; GELUK, A.; SMITH, S.G.; STEWART, A.L.; FRIGGEN, A.H.; FRANKEN, K.L.M.C.; VERDUYN, M.J.C.; MEIJGAARDEN, K E.; VOSKUIL, M.I.; DOCKRELL, H.M.; HUYGEN, K.; OTTENHOFF, T.H.M.; KLEIN, M.R.. Lack of Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR Regulon Proteins following *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination *Infect Immun.* July; 75(7): 3523–3530, 2007.

MCNAIR, J.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R.M.; MACKIE, D.P.; POLLOCK, J.M. Characterization of the Early Antibody Response in bovine Tuberculosis: MPB 83 is an Early Target with Diagnostic Potential. *Scand. J. Immunol.* 53, 365-371, 2001.

MIRANDA, A.; AMADEU, T.P.; SCHUELER, G.; ALVARENGA, F.B.F.; DUPPRÉ, N.; FERREIRA, H.; NERY, J.A.C.; SARNO, E.N.. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology.* November; 51(5): 649–656, 2007.

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J.. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.*, 40, 111-124, 1994.

MUSTAFA, A.S.; SKEIKY, Y.A.; AL-ATTIYAH, R.; ALDERSON, M.R.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M.. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in *Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated and *M. bovis*-Infected Cattle. *Infect Immun.* August; 74(8): 4566–4572, 2006.

NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J.. Pathogenesis of *Mycobacterium* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, 40, 41-52, 1994a.

NEILL, S.D.; CASSIDY, J.; HANNA, J.; MACKIE, D.P.; POLLOCK, J.A.; CLEMENTS, A.; WALTON, E.; BRYSON, D.G. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin

test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet. Rec.*, August 6, 1994b.

NEONAKIS, K.I.; GITTI, Z.; KRAMBOVITIS, E.; SPANDIDOS, A.D.; Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J. Microbiol. Methods*, Volume 75, Issue 1, September, Pages 1-11, 2008.

OIE, 2007; <http://www.oie.int/wahid-prod/public.php>. WAHID Interface Acessado em 12 de Agosto de 2008.

OIE, Terrestrial Manual, 2008. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf, acessado em 15 de julho de 2009

OLIVEIRA, I.; MELO, H.; CÂMARA, A.; DIAS, R.; SOTO-BLANCO, B.. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 395-400, 2007

PAHO/WHO, 2006. <http://bvs.panaftosa.org.br/docs/level2.php?channel=textoc&lang=es>. Acessado 22 Jan 2009

PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; HERMOSA DE MENDOZA, J.. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*, 127, 315-324, 2008.

PATRICIA C.A.M.; BUIJTELS, PIETER L.C. PETIT Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens *J. Microbiol. Methods*, Volume 62, Issue 1, Pages 83-88, July 2005.

PIERCY, J.; WERLING, D.; COFFEY, T.J. Differential responses of bovine macrophages to infection with bovine-specific and non-bovine specific mycobacteria. *Tuberculosis*, 87, 415-420, 2007.

POLETTI, R.; KREUTZ, L.C.; GONZÁLES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G.. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Funo, RS. *Cienc. Rural* vol.34 no.2 Santa Maria Mar./Apr. 2004.

POLLOCK, J.M. & NEILL, S.D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. *Vet. J.*, 163, 115-127, 2002.

POLLOCK, J.M.; WELSH, M.D.; MCNAIR, J.. Immune Response in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108, 37-43, 2005.

PUROHIT, M.R.; MUSTAFA; TEHMINA T.; WIKER, H.G.; MØRKVE, H.G.O.; SVILAND, L. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64. *Diagn Pathol.* 2: 36; 2007.

RADFORD, A.J.; WOOD, P.R.; BILLMAN-JACOB, H.; GEYSEN, M.; MASON, T.M.; TRIBBICK, G. Epitope mapping of the *Mycobacterium bovis* secretory protein MPB 70 using overlapping peptide analysis. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 265-272, 1990.

RAJARAM, E.D.; APPAJI RAO, V.N.; MANICKAM, R. certain Epizootiological Features of Bovine Tuberculosis. *Vet. J.* 73, April, 435-438, 1996.

RIBEIRO, A. R. P; LOBATO, F. C. F; ABREU, V. L. V; FARIA, E. S; SILVA, J. A. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus/ Prevalence of bovine tuberculosis and brucellosis in Ilhéus, Bahia – Brazil. *Arq. bras. med. vet. zootec*; 55(1): 120-122, fev. 2003.

RITACCO, V.; KANTOR, I.N.; BARRERA, L. *et al.* Assessment of the sensitivity and specificity of ELISA for the detection of *Mycobacterial* antibodies in bovine tuberculosis. *J. Vet. Med., series B*, v.34, p.119-125, 1987.

RODGERS, J.D.; CONNERY, N.L.; MCNAIR, J.; WELSH, M.D.; SKUCE, R.A.; BRYSON, D.G.; MCMURRAY, D.N.; POLLOCK, J.M.. Experimental exposure of cattle to a precise aerosolized challenge of *Mycobacterium bovis*: A novel model to study bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 87, 405-414, 2007.

RODRIGUEZ, C.A.R.; ZUMÁRRAGA, M.J.; OLIVEIRA, E.M. DE D.; CATALDI, A.A.; ROMANO, M.I.; OTTO, H.H.; BONAFÉ, V.L.; FERREIRA NETO, J.S. Caracterização Molecular de Isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de Spoligotyping. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 71, n.3, p. 277-282, jul./set., 2004.

ROMERO, B.; ARANAZ, A.; JUAN, L.; ÁLVAREZ, J.; BEZOS, J.; MATEOS, A.; MAMPASO, E.G.; DOMÍNGUEZ, L. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* Isolates with the Same Spoligotyping Profile as Isolates from Animals. *J Clin Microbiol*. September; 44(9): 3405–3408, 2006.

RORING, S.; HUGHES, M. S.; SKUCE, R. A.; NEILL S. D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Vet. Microbiol*, Volume 74, Issue 3, 1 June, Pages 227-236, 2000.

ROTHEL, J.S.; JONES, S.L.; CORNER, L.A.; COX, J.C.; WOOD, P.R.. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.*, Vol. 67, N^o4, April, 1990.

ROTHEL, J.S.; JONES, S.L.; CORNER, L.A.; COX, J.C.; WOOD, P.R.. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust. Vet. J.*, Vol 69, N^o1, January 1992.

ROXO, E. Situação Atual da Tuberculose Bovina no Brasil. Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, PNCE bovine tuberculosis.

Secretaria de Defesa Agropecuária. Docum. PNCE bovine tuberculosis DDD2005, São Paulo, pp.1-5. 2005.

RUGGIERO, A.P.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A.; ROXO, E.. Tuberculose Bovina: Alternativas para o Diagnóstico. *Arq. Inst. Biol.* v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

RUSSELL, A.D.; YARNYCH; V.S. AND A. V.. KOULIKOVSKII,. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases. Geneva; OMS; 62 p. 1984.

RYAN T. J.; BUDDLE B. M.; DE LISLE G. W. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.*, 69, 57–61, 2000

SALFINGER, M. & PFYFFER, G.E.. The New Diagnostic Mycobacteriology Laboratory. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, November, p.961-979, 1994.

SAMPERIO, P.M.; TREJO, A.; PÉREZ, A.. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Induces CCL5 Secretion via the Toll-Like Receptor 2-NF- κ B and -Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathways. *Clin Vaccine Immunol.* February; 15(2): 277–283, 2008.

SANTOSUOSSO, M.; MCCORMICK, S.; ZHANG, X.; ZGANIACZ, A.; XING Z..INTRANASAL Boosting with an Adenovirus-Vectored Vaccine Markedly Enhances Protection by Parenteral *Mycobacterium bovis* BCG Immunization against Pulmonary Tuberculosis. *Infect Immun.* August; 74(8): 4634–4643, 2006.

SEQUEIRA, M.D.; RITACCO, V.; KANTOR, I.N. In: Thoen, O., Gilsdorf, M.J., Steele, J. (Eds.), *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Blackwell Publishing, Ames, IA. 2005.

SILVA, E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 78, 111-117, 2001.

SKINNEER, M.A.; PARLANE, N.; MCCARTHY, A.; BUDDLE, B.M. Cytotoxic T-cell responses to *Mycobacterium bovis* during experimental infection of cattle with bovine tuberculosis. *Immunology* 110, 234-241, 2003.

SOBRAL, L.F. Pesquisa de *Mycobacterium bovis* entre cepas de micobactérias isoladas no Complexo Hospitalar HUCFF/IDT-UFRJ no período de 2005-2006. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica Programa acadêmico de tuberculose, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

SOPP, P.; HOWARD, C.J.; HOPE, J.C. FLOW Cytometric Detection of Gamma Interferon Can Effectively Discriminate *Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated Cattle from *M. bovis* – Infected Cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, p. 1343-1348, Dec. 2006.

SREEVATSAN, S., ET AL. A Multiplex Approach to Molecular Detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 2602-2610, July 2000.

THACKER T.C.; PALMER, V.M; WATERS R.W. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Volume 119, Issues 3-4, Pages 204-213, 15 October 2007.

THOEN, O.C.; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans- 2nd ed, 2006.

THOM, M.; MORGAN, J.M.; HOPE, J.C.; RAMOS, B.V.; MARTIN, M.; HOWARD, C.J. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (102) 399-412, 2004.

THOREL, M.F. Le role du laboratoire dans le contrôle de la tuberculose chez les animaux. *Le Point Veterinaire*, vl.26, n°159, abril 1994.

UNE, Y. & MORI, T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comparative Immunology, Microbiol. Infect. Dis.*, 30, 415-425, 2007.

VESOSKY, B.; TURNER, O. C.; TURNER, J.; ORME, I. M.. Gamma Interferon Production by Bovine $\gamma\delta$ T Cells following Stimulation with Mycobacterial Mycolylarabinogalactan Peptidoglycan. *Infect Immun.* August; 72(8): 4612–4618. 2004

WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; LISLE, G.W.. Detection of *Mycobacterium* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, (43) 227-240, 1995.

WATANABE, Y.; WATARI, E.; MATSUNAGA, I.; HIROMATSU, K.; DASCHER, C.C.; KAWASHIMA, T.; NOROSE, Y.; SHIMIZU, K.; TAKAHASHI, H.; YANO, I.; SUGITA, M. BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. *Vaccine*, Volume 24, Issues 29-30, Pages 5700-5707, 17 July 2006.

WATERS, R.W.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; BANNANTINE, J.P.; VORDEMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; MCNAIR, J.; POLLOCK, J.M.; ANDERSEN, P.; LYASHCHENKO, K.P.. Early Antibody Responses to Experimental *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Clin. Vac. Immunol.*, p. 648-654, June 2006b.

WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; MINION, F.C.; DAVIS, W.C. Antigen-specific proliferation and activation of peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected reindeer. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Pages 263-277 Volume 111, Issues 3-4, 15 June 2006 (c).

WELSH, M.D.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R.M.; MCNAIR, J.; SKUCE, R.A.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M.. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, 114, 101-111., 2005.

WHIPPLE, D.L.; BOLIN, C.A.; DAVIS, A.J.; JARNAGIN, J.L.; JHONSON, D.C.; NABORS, R.S.; PAYEUR, J.B.; SAARI, D.A.; WILSON, A.J. & WOLF, M.M. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-

interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Am. J. Vet. Res.*, 56, n.4, .415-19, 1995.

WHO, Bulletin of the World Health Organization, 72 (6): 851-857, 1994.

WIKER, G.H. & HARBOE, M. The Antigen 85 Complex: a Major Secretion Product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.*, p. 648-661, Dec. 1992.

WIKER, H. G.; LYASHCENKO, K.P.; AKSOY, A.M.; LIGHTBODY, K.A.; POLLOCK, J.M.; KOMISSARENKO, S.V.; BOBROVNIK, S.O.; KOLESNIKOVA, I.N.; MYKHALSKY, L.O.; GENNARO, M.L.; HARBOE, M. Immunochemical Characterization of the MPB70/80 and MPB83 Proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Immun.*, p. 1445–1452, Apr. 1998.

WIKER, H.G.; HARBOE, M.; LEA, T.E.. Purification and Characterization of Two protein Antigens From the Heterogenous BCG85 Complex in *Mycobacterium bovis* BCG. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 81: 298-306, 1986.

WOOD, P.R & ROTHEL, J.S. *In vitro* immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*, 40 (1-2): 125-135, 1994.

WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; PLACKETT, P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ interferon. *Res. Vet. Sci.*, 49, 46-49, 1990 a.

WOOD, P.R.; ROTHEL, J.S.; MCWATHERS, P.G.D.; JONES, S.L. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for Bovine Gamma-Interferon. *Vet. Immunol. Immunopatho.*, (25) 37-46, 1990 b.

WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; BALDOCK, C.; JONES, S.L.; COUSINS, D.B.; MCCORMICK, B.S; FRANCIS, B.R.; CREEPER, J.; TWEDDLE, N.E.. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.*, Vol 68, N^o9, September 1991.

YESILKAYA, H.; BARER, M.R.; PETER W. Andrew Antibiotic resistance may affect alkali decontamination of specimens containing mycobacteria *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, Volume 50, Issue 2, Pages 153-155, October 2004.

YOUNG, J.S.; GORMLEY, E.; WELLINGTON, E.M.H.. Molecular Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in Soil. *Appl Environ Microbiol.* April; 71(4): 1946–1952, 2005.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIOVARANTI, R.L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E.. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopses and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. Mem Inst of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 749-752, 2001.

ANEXOS

ANEXO I

Artigo completo publicado em periódico:

FIGUEIREDO, E ; SILVESTRE, F.G ; CAMPOS, W.N. ; FURLANETTO, L. ;
MEDEIROS, L. ; LILENBAUM, W. ; FONSECA, L. S. ; SILVA, J.T. ; PASCHOALIN,
V. . Identification of *Mycobacterium bovis* Isolates by a multiplex PCR. *Brazilian
Journal of Microbiology*, v. 40, p. 231-233, 2009.

ANEXO II

Artigos aceitos para publicação:

LILENBAUM, W. ; MARASSI, C. D ; VARGES, R. ; MEDEIROS, L. ; OELEMANN, W. ; FONSECA, L. S. . Occurrence of false-positive results in three Paratuberculosis - ELISAs performed in a tuberculous herd. Aceito para publicação. *Veterinary Research Communications*, 2009.

LILENBAUM, W; MEDEIROS, L.: MARASSI, C.D. The use of a Gamma-Interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis. Aceito para publicação. *Acta Tropica*, 2009.

ANEXO III

Artigo enviado para publicação:

MEDEIROS, L.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.S.; LILENBAUM, W. BOVINE TUBERCULOSIS: AN UPDATE. Artigo enviado para publicação ao Brazilian Journal of Microbiology, 2009.

ANEXO IV

Artigo em fase de redação:

MEDEIROS, L.; MARASSI, C.D.; DUARTE, R.S.; SILVA, M.G.; LILENBAUM, W.
Decontamination methods for primary isolation of *Mycobacterium bovis* in
paucibacillary samples of bovine origin.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)