



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

ELIOMAR DE MOURA SOUSA

**UTILIZAÇÃO DE TESTE CERVICAL COMPARATIVO FRENTE A UM ENSAIO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM
BOVINOS DA RAÇA NELORE**

**BELÉM-PA
2013**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

ELIOMAR DE MOURA SOUSA

**UTILIZAÇÃO DE TESTE CERVICAL COMPARATIVO FRENTE A UM ENSAIO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM
BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia para obtenção do título de Magister Science.

Área de concentração: **Saúde e Meio Ambiente**

Orientador: **Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana**

Co-orientador: **Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb**

**BELÉM-PA
2013**

Sousa, Eliomar de Moura

Utilização de teste cervical comparativo frente a um ensaio imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico da tuberculose em bovinos da raça Nelore / Eliomar de Moura Sousa. - Belém, 2013.

66 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2013.

1. Bovinos 2. *Mycobacterium bovis* 3. Elisa 4. Teste cervical comparativo

CDD – 636.2089



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ELIOMAR DE MOURA SOUSA

**UTILIZAÇÃO DE TESTE CERVICAL COMPARATIVO FRENTE A UM ENSAIO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM
BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana – Orientador

Universidade Federal Rural da Amazônia

Profa. Dra. Carla Cristina Guimarães de Moraes 1ª Examinadora

Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Washington Luiz de Assunção Pereira – 2ª Examinador

Universidade Federal Rural da Amazônia

Profa. Dra. Andréa Maria Góes Negrão – 3ª Examinadora

Universidade Federal Rural da Amazônia

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, irmã, esposa e
amigos, que estão ao meu
lado em cada batalha!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Deus misericordioso e à intercessão de Nossa Senhora, que me fortalecem e ao meu lado me ajudam vencer todos os desafios.

Ao Professor Doutor Rinaldo Batista Viana, que acreditou em mim e proporcionou essa oportunidade de aprofundar meus conhecimentos científicos. Disciplina, honestidade e generosidade são qualidades que o senhor se faz como referência. Muito obrigado, conterrâneo!

Ao Professor Doutor Alexandre do Rosário Casseb, bem como todo o seu grupo de pesquisa, por ter me acolhido como co-orientador.

Ao Prof. Dr. Claudio Cabral Campello pela valiosa ajuda na colaboração com a análise dos resultados.

Ao Mestre Bruno Moura pela valiosa colaboração no trabalho.

Aos meus AMIGOS do grupo PETVet/Gaia, em especial Damazio Campos, André Mendonça, Antônio Soares, Gabriel Furtado, Pedro Ermita, Aline Kzam, Beatriz e Sandro Patroca pela colaboração na execução do experimento.

Aos meus pais José Elias de Sousa e Maria Dulce de Moura Sousa, pelo apoio emocional, financeiro, espiritual diariamente me dado. Obrigado por compreenderem as ausências nos dias dos pais, nos dias das mães, nas confraternizações em família e mesmo assim, em todos esses momentos estarem rezando por mim, é imensurável o amor que sinto por vocês.

À minha irmã Elizana de Moura Sousa pelas palavras de incentivo e valiosa companhia quando moramos juntos. Zaninha, tu és muito especial!

À minha esposa Josiane Oliveira de Sousa pela absoluta dedicação e compreensão. Só o teu olhar já me conforta, tua presença me faz mais forte e aumenta minha vontade de vencer. Eu te amo!

Aos meus amigos e familiares, sei que sempre estiveram rezando pela minha vitória;

À CAPES/CNPq pelo fomento concedido para realização do experimento por meio do CT - AÇÃO TRANSVERSAL / Chamada Pública MCT/CNPq/MEC/CAPEs - Ação Transversal nº 06/2011 - Casadinho/Procad Processo nº 552215/2011-2.

À Dra. Silvia Zimmerman, Dra. Andréa Carneiro e à Dra. Karen Vigorito da IDEXX/MADASA pela colaboração na obtenção dos kits.

Ao Dr. Ricardo Spacagna Jordão e ao Instituto Biológico de São Paulo pela concessão das tuberculinas utilizadas nesse estudo.

À Agência de Defesa Agropecuária do Pará pela colaboração na disponibilização dos dados de prevalência de tuberculose no estado do Pará.

Aos proprietários e funcionários das Fazendas que nos permitiram utilizar seus animais e instalações e nos auxiliaram na execução do experimento.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema de execução do IDEXX ELISA <i>M. bovis</i> para diagnóstico da tuberculose em bovinos	33
Figura 2	Distribuição da prevalência da tuberculose bovina, determinada pelo teste cervical simples ou da prega caudal, de acordo com a mesorregião do estado do Pará, no ano de 2011	46
Figura 3	Distribuição da prevalência da tuberculose bovina, determinada pelo teste cervical simples ou da prega caudal, de acordo com a mesorregião do estado do Pará, no ano de 2012	47

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1	Caracterização dos locais do experimento e da amostragem em cada rebanho estudado de acordo com a fazenda e o município	31
Quadro 2	Fórmulas utilizadas para calcular a validação do teste e diagnóstico de tuberculose e o resultado das análises das amostras	32
Quadro 3	Interpretação do teste de tuberculina cervical comparativo em bovinos de acordo com o Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (BRASIL, 2006)	34

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Casos de tuberculose diagnosticados no estado do Pará no ano de 2011 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA	38
Tabela 2 Casos de tuberculose diagnosticados no estado do Pará no ano de 2012 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA	42
Tabela 3 Resultado percentual do teste cervical comparativo e ELISA IDEXX <i>M. bovis</i> para diagnóstico da tuberculose em bovinos da raça Nelore na Mesorregião do Nordeste Paraense	50

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.2 COLHEITA DE SANGUE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	31
3.3 TESTES REALIZADOS.....	32
3.3.1 Teste Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA.....	32
3.3.2 Teste cervical comparativo.....	34
3.4 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DA ARTE DA DOENÇA NO ESTADO DO PARÁ.....	35
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 SITUAÇÃO DA TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DO PARÁ.....	37
4.2 UTILIZAÇÃO DO ELISA IDEXX <i>M. bovis</i> FRENTE AO TESTE CERVICAL COMPARATIVO PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA.....	48
4.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE CERVICAL COMPARATIVO FRENTE AO ELISA IDEXX <i>M. bovis</i> PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA.....	53
5 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	58

RESUMO

De ocorrência mundial, a tuberculose bovina é uma zoonose de difícil controle devido, principalmente, a falta de um ensaio de diagnóstico para detectar os animais infectados em todas as fases. Diante do exposto pretendeu-se com este estudo comparar a eficácia do ELISA múltiplex e do teste cervical comparativo utilizado para o diagnóstico da tuberculose em bovinos da raça nelore, determinar a ocorrência da infecção nos rebanhos estudados nas mesorregiões do nordeste paraense e metropolitana de Belém e avaliar a eficácia dos métodos, mediante comparação entre os resultados obtidos. O estudo contou com 400 animais da raça Nelore criados em cinco fazendas (Castanhal, São Francisco do Pará, Garrafão do Norte, Santa Izabel, Capitão Poço), sendo uma fazenda em cada município. Estas ficam assim distribuídas: na mesorregião do nordeste paraense os municípios de Capitão Poço e Garrafão do Norte situados na microrregião Guamá e a cidade de São Francisco do Pará na microrregião Braganfina, e na mesorregião metropolitana de Belém os municípios de Castanhal e Santa Izabel pertencentes à microrregião de Castanhal. Os bovinos foram submetidos ao teste cervical comparativo, seguindo as normas preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT. No dia da inoculação do derivado proteico purificado, para realização do imunoensaio IDEXX ELISA *M. bovis*, seguindo o protocolo padronizado pelo fabricante, amostras de sangue foram colhidas dos animais, centrifugadas e alíquotadas em criotubos para posterior análise. A estatística descritiva dos dados foi representada pelas frequências de animais positivos ou negativos, tanto entre os referidos exames (ELISA e teste cervical comparativo) como entre as diferentes fazendas (1, 2, 3, 4 e 5). No experimento realizado na Fazenda 1 e 2, dos 80 animais tuberculinizados, 1 bovino em cada uma delas teve resultado positivo, os demais se mostraram negativos para infecção por *M. bovis*. Já nas Fazendas 3, 4 e 5 todos os animais tiveram resultado negativo. O diagnóstico pelo IDEXX ELISA *M. bovis* identificaram 5,5% (22/400) de animais positivos para tuberculose, sendo que na Fazenda 1 foram diagnosticados 8,75% (7/80), na Fazenda 2, 10% (8/80) dos animais examinados foram positivos; na Fazenda 3, 6,25% (5/80) dos bovinos examinados foram positivos e nas Fazendas 4 e 5 apenas um caso positivo em cada, 1,25%. De acordo com os dados obtidos no presente estudo pode-se inferir que a tuberculose bovina é uma doença presente nos rebanhos paraenses nas mesorregiões do nordeste paraense, metropolitana de Belém, baixo amazonas, sudeste paraense e sudoeste paraense. Tal fato denota a necessidade de uma constante vigilância sanitária no trânsito de bovinos e adoção de medidas de controle e profilaxia da doença a partir de métodos diagnósticos complementares aos preconizados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (teste cervical simples e da prega caudal), buscando assegurar alta sensibilidade e especificidade na identificação do agente etiológico da tuberculose bovina. Ainda foi possível concluir que o teste cervical comparativo quando confrontado com um ELISA múltiplex, apresenta uma baixa sensibilidade, não sendo capaz de identificar todos os animais positivos do rebanho, fato este muito grave, visto que animais positivos, diagnosticados como falso negativos são fontes permanentes de infecção e disseminação do agente no rebanho.

Palavras-chave: Bovinos; *Mycobacterium bovis*; Diagnóstico, ELISA, teste cervical comparativo

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a zoonotic disease of worldwide occurrence. This disease is difficult to control, mainly due to the lack of a diagnostic test to detect sick animals at all stages of infection. Through the comparison between the multiplex ELISA test and cervical comparative test for the diagnosis of tuberculosis in cattle, this study aimed to evaluate the response of the ELISA or cervical comparative test, to determine the occurrence of infection in herds in northeastern Pará and to evaluate the efficacy of the methods by comparing the results obtained. Were used 400 Nelore cattle, raised on five farms (Castanhal, São Francisco do Pará, Garrafão do Norte, Santa Izabel do Pará, and Capitão Poço), one farm in each city. These are distributed as follows: in the middle region of northeastern Pará municipalities of Captain Wells and Carboy North Guamá located in the city of São Francisco do Pará in Bragantina microregion, and metropolitan of Belém municipalities Castanhal and Santa Izabel belonging to microregion of Castanhal. The animals were subjected to comparative cervical test, following the standards proposed by the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis - PNCEBT. On the day of inoculation of purified protein derivative, blood samples were collected from the animals, and after centrifugation to obtain serum, carry out the IDEXX ELISA immunoassay *M. bovis*, following the protocol standardized by the manufacturer. Descriptive statistics of the data was represented by the frequency (%) of animals positive or negative, both among such tests (ELISA and comparative cervical test) and between different farms (1, 2, 3, 4 and 5). In the experiment conducted at Farm 1 and 2, only 1 of 80 animals subjected to cervical comparative test showed positive results. The others showed up negative for *M. bovis* infection. Already at Farms 3, 4 and 5, all animals were negative for the same test. Diagnosis by IDEXX ELISA *M. bovis* identified 5.5% (22/400) of animals positive for tuberculosis. Farm 1 were diagnosed 8.75% (7/80), at Farm 2, 10% (8/80) of the animals examined were positive, the Farm 3, 6.25% (5/80) of cattle examined were positive. Farms 4 or 5 presented only one positive case each, with 1.25%. According to the data obtained in this study could be inferred that bovine tuberculosis is a disease present in the regions of northeastern Pará, Belém metropolitan, low Amazon, southeastern Pará Pará and southwest. This fact indicates the need for a constant health monitoring in transit of cattle and adoption of measures for control and prevention of the disease from the complementary diagnostic methods recommended by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (simple test cervical and caudal fold), seeking ensure high sensitivity and specificity in identifying the causative agent of bovine tuberculosis. Also, it was concluded that the comparative cervical test when confronted with ELISA, has a low sensitivity, not being able to identify all positive animals from the herd. This fact is severe, since positive animals diagnosed as false negatives are permanent sources of infection and spread of this disease in the herd.

Keywords: Beef cattle; *Mycobacterium bovis*; Diagnosis, ELISA, comparative cervical test



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das mais antigas doenças infectocontagiosas diagnosticadas em bovinos. O agente etiológico é o *Mycobacterium bovis* que juntamente com outras micobactérias, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii* e *Mycobacterium microti*, formam o "complexo *Mycobacterium tuberculosis*" dos mamíferos, acometendo especialmente o sistema respiratório dos hospedeiros infectados (COLLINS, 2001; ACHA; SZYFRES, 2003). De ocorrência mundial, a tuberculose determina prejuízos à pecuária e riscos à saúde humana pelo consumo de produtos de origem animal contaminados com a bactéria (LILENBAUM, 2000).

Apesar do controle da infecção em animais ser realizado em muitos países e, conseqüentemente refletir significativa diminuição da infecção humana, nos últimos anos a enfermidade tem se estabelecido como um problema reemergente em vista do surgimento de cepas multiresistentes aos antibióticos de eleição para o tratamento da infecção no ser humano, da disseminação do vírus da imunodeficiência humana, do estabelecimento de reservatórios silvestres e da persistência da infecção no gado doméstico, especialmente nas regiões em desenvolvimento (ABALOS; RETAMAL, 2004).

A tuberculose bovina apresenta conseqüências econômicas significantes para a pecuária nacional e mundial (NEILL et al., 1994), atribuídas às perdas diretas e indiretas resultantes da diminuição do ganho de peso e da produção de leite, do descarte precoce e a eliminação de animais de alto valor zootécnico, da condenação de carcaças ao abate, assim como da morte dos animais. Estima-se que os animais infectados percam de 10% a 25% de sua eficiência produtiva (BRASIL, 2006).

A enfermidade encontra-se disseminada em todo território nacional nas mais variadas regiões pecuárias responsáveis pelo contingente populacional de 212,8 milhões de cabeças (IBGE, 2012). Dados de notificações oficiais indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais reagentes à tuberculina no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006). Já nas regiões do centro e sul do estado de Minas Gerais, além de todo o Triângulo Mineiro, importante *cluster* de produção pecuária nacional, descreveu-se em 1999 uma prevalência de 0,8% de animais infectados (BRASIL, 2006).

Segundo informações da Agência de Defesa Agropecuária do estado do Pará (ADEPARÁ, 2013), no ano de 2011, foram notificados 0,34 % (99/29.151) casos de tuberculose em bovinos examinados pelo teste cervical simples ou da prega caudal. Em 2012

a notificação foi de 444 casos positivos de 64.802 animais examinados, denotando um aumento do índice de 0,34% em 2011 para 0,69% em 2012 (ADEPARA, 2013).

A tuberculose bovina, uma zoonose que afeta entre outras espécies, os seres humanos (DE VOS et al., 2001; POLLOCK; NEILL, 2002; AMANFU, 2006; MICHEL et al., 2006), tem difícil controle devido a falta de uma vacina eficaz, a presença de reservatórios de vida selvagem, e a falta de um ensaio de diagnóstico com a sensibilidade e especificidade suficientes para detectar os animais doentes em todas as fases de infecção (WOOD; JONES, 2001).

Destarte, os métodos mais confiáveis e inequívocos, considerados “padrão-ouro” de diagnóstico, são aqueles baseados na visualização ou isolamento do agente etiológico a partir de lesões oriundas de animais doentes. No entanto, para o diagnóstico direto, a dificuldade de obtenção rotineira de amostras *in vivo* torna pouco viável sua utilização, uma vez que é pouco exequível a realização de lavados bronco-alveolares em bovinos a campo. Dessa forma, métodos de diagnóstico direto como a cultura bacteriológica, a baciloscopia, o exame macroscópico de tecidos e a histopatologia limitam-se ao diagnóstico *post mortem* da infecção, quando é permitida a necropsia e facilitada a colheita de amostras confiáveis (LILENBAUM, 2000).

Por esse motivo, o diagnóstico da infecção em bovinos *in vivo* comumente é realizado por meio de métodos indiretos, principalmente os testes imunológicos baseados na resposta mediada por células, como a intradermorreação (LILENBAUM, 2000). Como técnica complementar ao teste intradérmico na detecção de anticorpos para *M. bovis* em animais expostos ao agente, um teste sorológico com boa sensibilidade e especificidade seria uma alternativa viável (ADAMS, 2001).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e em 2004 no estado do Pará, tem como objetivo combater estas enfermidades, reduzir sua incidência e prevalência, a fim de minimizar os prejuízos econômicos e garantir a segurança alimentar, aumentando a competitividade dos produtos brasileiros no mercado internacional. O programa determina como método padrão de diagnóstico da tuberculose bovina a tuberculinização intradérmica (BRASIL, 2006).

No entanto, sabe-se que os testes intradérmicos tem limitações quanto à sensibilidade e especificidade (MONHAGAN, 1994), e que em função disso a credibilidade do diagnóstico é posta em risco dada a ocorrência de reações falso-positivas e falso-negativas, com o abate desnecessário de animais e ou permanência de animais infectados nos rebanhos. Portanto,

torna-se necessário a confirmação de animais positivos por meio de outros métodos, garantindo a confiabilidade do diagnóstico.

Embora, os métodos de medição de hipersensibilidade do tipo retardada (teste da pele) para Derivado de Proteína Purificada (PPD) e um ensaio *in vitro* indireto que mede a concentração de interferon gama (IFN γ) produzido em resposta à estimulação com PPD (MONHAGAN, 1994; WOOD; JONES, 2001), tenham provado serem úteis, faltam aos mesmos altas sensibilidade e especificidade, devido a uma resposta de reação cruzada imunológica. Sobre isso, estudos mostraram que a resposta de anticorpos para *M. bovis* não é uniforme, sem evidência de uma resposta dominante persistente para um único antígeno em qualquer fase da infecção (AMADORI et al., 2002; COUSINS; FLORISSON, 2005; ARANAZ et al., 2006; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Esta constatação sugeriu que um ensaio com múltiplos antígenos seria necessário para detectar os animais em diferentes fases de infecção (AMADORI et al., 2002; AAGAARD et al., 2006). Todavia, a necessidade de utilizar múltiplos antígenos em um teste introduziu outro desafio, pois a avaliação do tipo de padrão de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) mostrou que a sensibilidade e especificidade são reduzidas quando antígenos múltiplos são combinados para análise em um único poço, limitando assim a utilização de um ELISA convencional (LYASHCHENKO et al., 2000).

Para resolver este problema, foi desenvolvido um ensaio multiplex que pode, simultaneamente, detectar e analisar a resposta a múltiplos antígenos marcados em um poço único num formato de matriz de 96 poços da placa. Demonstrou-se um avanço no poder de diagnóstico com uma abordagem de múltiplos antígenos sobre a dos métodos padrão da indústria (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). O IDEXX ELISA *M. bovis*¹ é um ensaio imunoenzimático que aponta estas características, garantindo percentuais de sensibilidade e especificidades superiores à maioria dos diagnósticos de tuberculose tanto para diagnóstico primário como complementar nos casos de resultados inconclusivos do diagnóstico por teste cervical simples ou comparativo.

Diante do exposto pretendeu-se com este estudo verificar a eficácia do teste cervical comparativo frente a um teste ELISA multiplex utilizado para o diagnóstico da tuberculose em bovinos da raça nelore, objetivando:

- 1) Determinar a ocorrência da infecção nos rebanhos estudados nas mesorregiões do nordeste paraense e metropolitana de Belém ;

¹ IDEXX ELISA *M. bovis*. Destina-se a detecção de anticorpos de *Mycobacterium bovis* em amostras de soro e ou plasma bovino.

- 2) Determinar o estado da arte da doença no estado do Pará nos anos de 2011 e 2012;
- 3) Avaliar a resposta do ELISA e do teste cervical comparativo, mediante comparação entre os resultados obtidos.



REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Inicialmente, acreditava-se que a domesticação do gado bovino, a qual ocorreu entre 10 mil e 25 mil anos, teria permitido a passagem de um patógeno micobacteriano de animais domésticos para seres humanos. Em sua adaptação a um novo hospedeiro, a bactéria teria evoluído para uma espécie mais próxima de *M. tuberculosis* (NEILL et al., 2005). Entretanto, estudos genéticos atuais de distribuição de deleções e inserções nos genomas do complexo *M. tuberculosis* fornecem fortes evidências para uma evolução independente tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis*, partindo de outra espécie precursora comum, possivelmente *M. canettii* (BROSCH et al., 2002).

Espécies silvestres são hospedeiras que atuam na manutenção da infecção. Dessa forma, contribuem para a persistência e difusão da enfermidade, e interferem na eficácia de programas de erradicação da tuberculose em rebanhos bovinos (GORMLEY; COLLINS, 2000).

Apesar de muitas espécies serem susceptíveis a este bacilo, somente algumas atuam como hospedeiros mantenedores da infecção, conseguindo transferi-la efetivamente para outras espécies, como, por exemplo, os bovinos, os bubalinos, o bisão e os cervos (WATER et al., 2003).

Pequenos ruminantes, equídeos, felídeos, canídeos e suídeos se infectam após exposição ao *M. bovis* e são denominados hospedeiros disseminadores por transmitirem o agente a outras espécies. No entanto, esses animais não são capazes de manter a infecção na espécie quando não há a reinfecção por um hospedeiro mantenedor (SALAZAR, 2005).

Em bovinos e bubalinos, o *M. bovis* é o agente causal da tuberculose, porém essa espécie também infecta e provoca doença no homem, caracterizando a tuberculose bovina como uma zoonose (JORGE et al., 2004a).

Possíveis vias de transmissão para a infecção por *M. bovis* são, as respiratórias, alimentares, umbilicais, cutâneas e venéreas. Na prática, a infecção nos bovinos é geralmente adquirida, quase exclusivamente, pela via aerógena, pela inalação de gotículas infectadas de tosse ou secreção nasal de um animal com tuberculose pulmonar ativa (NEILL et al., 1994). A via oral é geralmente mais importante em bezerros amamentando-se em vacas tuberculosas (PALMER; WATERS, 2006). Em casos de infecção congênita, a transmissão acontece via vasos sanguíneos umbilicais para o feto, a partir da infecção presente no útero da fêmea (NEILL et al., 1994).

Infecções por *M. bovis* em seres humanos podem ser adquiridas mais comumente por consumo de leite e derivados crus (ACHA; SZYFRES, 2003), levando ao desenvolvimento de doença extrapulmonar (GRANGE et al., 2001). Estudos de virulência em ratos sugerem que o *M. bovis* seja mais virulento que *M. tuberculosis* e isso pode se manifestar como maior habilidade para causar doença extrapulmonar (MEDINA et al., 2006). O risco é maior para crianças, idosos e pessoas com deficiência imunológica (BRASIL, 2006). No entanto, grupos ocupacionais que trabalham com bovinos infectados com *M. bovis*, em fazendas ou abatedouros, também podem desenvolver a doença, mais provavelmente na forma pulmonar (ARAÚJO et al., 2005).

A infecção por *M. tuberculosis* em bovinos é rara, mas pode haver transmissão aerógena para bovinos em contato com seres humanos infectados que estejam disseminando o agente (OCEPEK et al., 2005).

O foco de infecção da tuberculose é estabelecido após a interação do hospedeiro com o patógeno. Quando a infecção se dá pela via respiratória, o pulmão é o primeiro órgão atingido, podendo se estender aos linfonodos regionais. Na via de infecção digestiva, a lesão se desenvolve, inicialmente, no sítio de entrada, principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. Quando da generalização do processo, a lesão pode atingir todos os órgãos (ROXO, 1997).

As lesões primárias geralmente possuem coloração amarelada, se apresentando em forma de nódulos de um a três centímetros de diâmetro, ou mais, de aspecto purulento e com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar calcificação no centro da lesão nos casos mais avançados, caracterizando uma necrose de caseificação (BRASIL, 2006). Geralmente as lesões pulmonares são encontradas no terço distal do lobo caudal do pulmão. As lesões de aspecto caseoso, características da doença, são encontradas com mais frequência nos linfonodos da cabeça, do pescoço, mediastínicos e mesentéricos, nos pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio, embora qualquer tecido possa ser afetado (BRASIL, 2006).

A tuberculose possui distribuição mundial sendo responsável por determinar morbidade e mortalidade de bovinos em várias partes do mundo. Essa enfermidade provoca a queda da eficiência reprodutiva de machos e fêmeas e um baixo aproveitamento da carcaça, causando prejuízos irrecuperáveis ao produtor, principalmente em criações intensivas, como de bovinos leiteiros e em países em desenvolvimento (JORGE, 2001; WEDLOCK et al., 2002). De acordo com Jorge (2001) e Wedlock et al. (2002), a prevalência é maior, e assume grande importância para a saúde pública, pecuária e comércio internacional de animais e seus subprodutos.

A tuberculose já foi erradicada em vários países como na Dinamarca (1980), na Finlândia, Holanda e Suíça (1995), na Áustria e em algumas regiões da Itália (1999), na Alemanha e Luxemburgo (1997), na França (2001) e na Bélgica em 2003 (VALENTE, 2009).

Gormley e Collins (2000) realizaram um estudo na Irlanda que apontou as espécies silvestres como hospedeiras e responsáveis pela manutenção do *M. bovis*, contribuindo para a difusão do agente em animais domésticos, a exemplo do furão (*Meles meles*), comprometendo a eficácia de programas de erradicação da tuberculose em rebanhos bovinos. Estes autores destacaram inclusive, uma prevalência da tuberculose na Irlanda em torno de 8,8% de casos.

Em pesquisas feitas em alguns países Africanos a tuberculose foi classificada como a principal causa de condenação de carcaça em matadouros de Burkina Faso, aponta ainda que na Tanzânia a prevalência da doença em rebanhos bovinos de corte e leite foi de 1 e 2 %, respectivamente (SHIRIMA, 2003).

Na América do Norte, a enfermidade encontra-se em um nível de controle avançado, observando-se no Canadá e EUA, índices de incidência da doença muito baixos, contando até com áreas livres de tuberculose bovina. Nos EUA o programa federal de controle da tuberculose bovina foi implantado em 1917, e em 1994 a prevalência da infecção foi estimada em 0,003% no rebanho bovino (SALAZAR, 2005). Todavia, em países fronteiriços aos Estados Unidos, como o México, a doença ainda ocorre em áreas endêmicas.

Levantamentos oficiais realizados no Brasil entre 1989 a 1998 indicaram que a prevalência média de animais infectados com tuberculose seja de 1,3% (BRASIL, 2006).

No Mato Grosso, Salazar (2005) examinou 57.641 animais abatidos entre os meses de Novembro de 2004 e Agosto de 2005 em três matadouros frigoríficos sob Inspeção Estadual, desses bovinos, 27 (0,05%) foram diagnosticados com lesões sugestivas de tuberculose e tiveram suas carcaças condenadas. Esta ocorrência é semelhante à descrita por Almeida (2004), que relata 0,013% (63/483.047) de casos positivos de tuberculose em um estudo semelhante realizado no estado do Mato Grosso do Sul e por Baptista et al. (2004), que encontraram prevalências de tuberculose em torno de 0,08% no estado de Minas Gerais e 0,04% no Goiás.

No Rio Grande do Sul, Würfel et al. (2008), baseados em registros do Serviço de Inspeção Estadual da Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio do Estado, fizeram um levantamento, entre os anos de 2004 e 2008, em 16 estabelecimentos de abate de bovinos na região de Pelotas. A prevalência da tuberculose nesse período foi de 0,28% (1.139/403.246) dos bovinos abatidos, apresentando a maior ocorrência de 0,40% no ano de 2005 e a menor de 0,20% em 2007. No município de Patos/PB, um estudo semelhante

revelou uma prevalência de 0,48% de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos (TABOSA et al., 2000).

No estado da Bahia, em 2012, Costa (2012) realizou um inquérito epidemiológico da tuberculose no período de outubro de 2008 a novembro de 2010 utilizando o método de diagnóstico baseado no teste cervical comparativo. Tendo dividido a pesquisa em dois circuitos pecuários, obteve uma prevalência de 0,08% (8/6.889) de animais positivos no primeiro e 0,66% (13/4.375) no segundo. Dados significativamente inferiores aos obtidos por Ribeiro et al. (2003) quando realizou um levantamento da doença em Ilhéus/BA, apontando prevalência de 2,8% dos 916 bovinos com idade igual ou superior a 24 meses.

Em trabalho realizado na mesorregião do sudoeste paranaense, onde foram tomados como amostra quatro municípios, examinou-se 13.214 animais por meio do teste cervical simples e a prevalência de tuberculose foi de 0,098 (SABEDOT et al., 2004).

No período de julho a dezembro de 2004 foi realizado um levantamento dos casos de tuberculose em animais abatidos no frigorífico de Lençóis Paulista/SP, em que durante a pesquisa foram abatidos 95.655 bovinos, sendo que deste total, 780 (0,81%) apresentaram lesões sugestivas de *Mycobacterium* (CRETELLA et al., 2006).

Pereira et al. (2009), em pesquisa realizada no município de Santa Rita/MA com 264 fêmeas bovinas submetidas ao teste cervical comparativo, diagnosticaram 12,12% (32/264) de reações positivas e 6,06% (16/264) de reações inconclusivas, definidas como suspeitos.

Alvim et al. (2007) realizaram em um frigorífico no município de Xinguara/PA, um levantamento dos animais notificados com enfermidades infectocontagiosas e parasitárias entre outubro de 2003 e maio de 2004. Na pesquisa constatou-se que do total de 8.277 bovinos, 111 (1,34%) tinham lesões sugestivas a infecção por *Mycobacterium* sp, resultados semelhantes aos encontrados por Ribeiro et al. (2003) que descreveram em seu estudo, 2,8% de animais positivos para tuberculose em um total de 916 animais examinados.

Estudo elaborado por Abrahão, Nogueira e Malucelli (2005) destaca ainda uma prevalência ao redor de 10% em rebanhos de vacas leiteiras no Brasil. A variação na prevalência da tuberculose nas diferentes regiões pode estar relacionada com vários fatores tais como: fonte de aquisição dos animais, a gestão, o clima, serviços de diagnóstico da tuberculose em cada propriedade (POLETO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008) e o sistema de produção, o tamanho do rebanho, idade, raça e presença de animais para produção de carne e de leite no mesmo rebanho (FLORES et al., 2005; ELIAS, 2008).

Estudos analisando fatores de risco associados à ocorrência de tuberculose em bovinos indicaram que algumas variáveis como sistema de produção, tamanho de rebanho, manejo,

idade, raça, introdução de animais e presença de animais de corte e leite nos rebanhos atuam como determinantes de prevalência de tuberculose (ASSEGED et al., 2000; OMER et al., 2001; PEREZ et al., 2002).

No Brasil, Belchior (2001) destaca as variáveis: grupo genético, sistema de produção, sistema de ordenha, resfriamento do leite e monitoramento da produção como fatores de risco para a incidência de tuberculose.

O desenvolvimento rural acompanhado pela tecnificação dos rebanhos, caracterizado pelas variáveis apontadas por Belchior (2001), as quais levaram a intensificação nos sistemas de produção pecuária, podem ser os principais responsáveis pelo aumento de novos casos de tuberculose bovina, principalmente em rebanhos leiteiros com animais de raças mais puras e, conseqüentemente mais produtivas (OLIVEIRA et al., 2008).

Nessas fazendas altamente tecnificadas, Oliveira et al. (2008) concluíram que o sistema de aleitamento artificial aumenta os riscos de contaminação de bezerros pelo leite de uma mãe positiva para tuberculose, quando misturado ao leite de vacas saudáveis, potencializado ainda pela alta densidade populacional de animais nos bezerreiros. Essa mesma expressividade dos riscos existem onde a alta produtividade é exigida em um curto intervalo de tempo. Sistema de produção intensivo, rebanhos com alta densidade populacional, animais de faixas etárias distintas criados conjuntamente, raças e aptidões diferentes, dividindo os mesmos piquetes bem como a introdução de animais novos nos rebanhos, sem o adequado controle sanitário, atuam como variáveis determinantes de prevalência de tuberculose.

Jorge et al. (2004a) também mencionaram a intensificação dos sistemas de produção pecuária como fator de aumento de novos casos da tuberculose bovina, principalmente em rebanhos leiteiros. Isso se deve ao confinamento e ao maior contato entre os animais, aumentando a predisposição à infecção. Os autores afirmaram ainda que rebanhos de corte não estão livres, podendo ocorrer casos em que o trânsito e o comércio de bovinos são praticados de forma intensiva, propiciando maior contato entre os animais, ou onde exista proximidade de rebanhos de corte e rebanhos de leite com bovinos portadores da doença.

Apesar de diversos estudos sobre vacinação e tratamento da tuberculose bovina, até o presente, os resultados obtidos não justificam a adoção dessas medidas como forma de controle da enfermidade (BRASIL, 2006). Porém, recentes avanços na tecnologia das vacinas contra tuberculose podem tornar a medida viável para imunizações de bovinos futuramente (VORDERMEIER et al., 2006).

O método mais confiável e inequívoco para o diagnóstico de doenças determinadas por bactérias é o isolamento e a identificação do agente etiológico. No entanto, essa prática torna-se pouco viável para uso rotineiro no diagnóstico da tuberculose bovina, devido à dificuldade na obtenção de amostras e a demora no crescimento do patógeno. Assim, apenas em uma pequena porcentagem de animais suspeitos ou positivos para a enfermidade realiza-se o diagnóstico definitivo. Desta forma, os métodos indiretos, baseados na resposta imune, são os mais utilizados para o controle da enfermidade. Outros testes auxiliares ou complementares, como a Proteína C-reativa (PCR), isolamento e provas bioquímicas podem ser utilizados para confirmar o diagnóstico, porém, de maneira geral, não são práticos no diagnóstico de rebanhos (JORGE et al., 2004b).

O diagnóstico clínico é pouco conclusivo, pois os sintomas podem ser confundidos com outras doenças, não obstante, torna-se importante para animais com tuberculose avançada, para os quais o teste da tuberculina pode não ser eficaz (BRASIL, 2006).

No início dos programas de controle da tuberculose bovina, quando as prevalências eram mais altas, o teste de tuberculinação era eficiente na detecção de animais infectados. No entanto, com a diminuição da prevalência da doença, a sensibilidade moderada (MONAGHAN et al., 1994) e a baixa especificidade do teste, devido a reações cruzadas com micobactérias atípicas, tornaram-se dificuldades relevantes para os programas de erradicação, que adotam essas técnicas diagnósticas (WOOD; JONES, 2001).

A tuberculinação pode ser utilizada na triagem de animais (teste da prega caudal e teste cervical simples) e na confirmação de um teste prévio (teste cervical comparativo), devendo ser efetuado em animais com idade igual ou superior a seis semanas de vida (BRASIL, 2006).

O teste tuberculínico foi desenhado para determinar a infecção espécie-específica por *M. bovis*. Na execução do mesmo, a inoculação intradérmica de pequenas quantidades de antígenos micobacterianos gera em 24-72h uma reação inflamatória local naqueles animais que responderam imunologicamente à prévia infecção por *M. bovis*.

Essa resposta é mediada por linfócitos T (Th1) os quais migram ao sítio de liberação do antígeno e reconhecem os peptídeos apresentados em conjunção com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de Classe II, presentes na superfície celular de macrófagos. Os linfócitos Th1 liberam citocinas, a exemplo da interleucina-2 (IL-2) e do interferon-gama (IFN- γ), que trabalham no endotélio vascular convocando células do sistema imune para o sítio de deposição do antígeno, esse recrutamento de linfócitos Th1, fagócitos,

fluidos e proteínas geram uma lesão visível, mensurada 72 horas depois, quando atingirá a fase mais intensa do processo inflamatório (TIZARD, 2002; WEDLOCK et al., 2002).

A prova intradérmica é laboriosa, já que exige a contenção e manejo dos bovinos duas vezes, uma para a inoculação da tuberculina e outra para a leitura dos resultados. Bovinos submetidos à prova intradérmica de tuberculinização tornam-se temporariamente anérgicos e em casos de reações inconclusivas, não podem ser testados novamente, por pelo menos 60 dias (AAGAARD et al., 2006). Animais em estágios avançados da doença ou logo no início da infecção, bem como infecções virais simultâneas (diarreia viral bovina – BVD) que deprimem o sistema imunológico ou fármacos com esse mesmo efeito, ou ainda tuberculina com prazo de validade vencido ou mal acondicionada também podem resultar em casos anérgicos, gerando reações falso-negativas no teste de intradermoreação (JORGE et al., 2004a), o que leva a permanência desses animais como fontes de infecção no rebanho.

Uma relação inversa ocorre entre o curso da resposta imune celular e humoral, na qual a última é preferencialmente detectada nos casos de tuberculose avançada (RITACCO et al., 1991). Dessa forma, os testes sorológicos ajudam a identificar os animais anérgicos, negativos na tuberculinização, em estágios avançados da infecção, complementando os resultados dos testes de imunidade celular (PLACKETT et al., 1989).

Além disso, os testes sorológicos podem elucidar situações epidemiológicas da doença em rebanhos, caracterizados por resultados duvidosos ou inconclusivos na tuberculinização (AMADORI et al., 1998). Dentre esses, os ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) apresentam claras vantagens, como possibilidade de testar um grande número de amostras em curto espaço de tempo e a automação na obtenção dos resultados (SOARES, 2001).

As primeiras padronizações de ELISA para diagnóstico da tuberculose bovina empregaram antígenos brutos ou Derivados Proteicos Purificados (PPD), os quais apresentaram problemas com reações cruzadas com micobactérias do grupo *avium/intracellulare* e baixo poder discriminatório entre animais infectados e não infectados (AMADORI et al., 2002).

Por essas razões, os estudos nessa área concentraram-se na identificação dos antígenos específicos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* relacionados à resposta humoral em animais infectados com *M. bovis*. A utilização de antígenos específicos desse complexo intrinsecamente aumenta a especificidade do diagnóstico sorológico, pois evita reações cruzadas induzidas por micobactérias do complexo *avium/intracellulare* (AMADORI et al., 2002).

O diagnóstico da tuberculose bovina também pode ser feito pela detecção de anticorpos contra *M. bovis*, onde diversos tipos de ensaios já foram padronizados para essa finalidade, como a imunofluorescência (BENNEDSEN, 1969), a aglutinação (YUGI; NOZAKI, 1972), o ELISA (RITACCO et al., 1987), a aglutinação em látex (LONYCH; KYSEL'OV, 1997), e a fluorescência de polarização (SURUBALLI et al., 2002). Entre estes, o ELISA destaca-se pelas vantagens de permitir o processamento de grande número de amostras em curto espaço de tempo e pela automação na leitura dos resultados (SOARES, 2001).

O ELISA no início utilizava antígenos não purificados de *M. bovis*, os quais apresentaram baixas sensibilidade e especificidade (AUER, 1987). Posteriormente, foram avaliados PPDs de diferentes cepas de *M. bovis* para padronização de ensaios imunoenzimáticos. Em geral, foi possível discriminar soros de animais de áreas livres de tuberculose bovina de animais positivos bacteriologicamente para *M. bovis* mediante a utilização de PPD das cepas AN5 e CEPANZO, porém o mesmo não foi possível com PPD da cepa BCG (RITACCO et al., 1988).

No Brasil, um ELISA com PPD foi comparado à tuberculinização intradérmica para detecção de animais infectados com *M. bovis*, sendo a sensibilidade e especificidade do primeiro teste de 86,7% e 90,6%, respectivamente e do segundo teste de 87,7% e 95,2%, respectivamente (LILENBAUM et al., 1999a).

Outro teste que avalia a resposta imune celular na infecção por *M. bovis* é a dosagem de IFN- γ . Bovinos infectados com *M. bovis* produzem linfócitos T de memória, os quais respondem rapidamente à estimulação *in vitro* com PPD, produzindo elevados níveis de IFN- γ , citocina que pode ser detectada por ensaio imunoenzimático. Esse teste é feito inicialmente pela incubação de sangue de bovinos com PPD durante doze horas, seguido de remoção do plasma e execução de ELISA de captura de antígeno, o qual utiliza anticorpo monoclonal anti-IFN- γ . Um controle de especificidade, com PPD de *M. avium*, também é executado (WOOD; JONES, 2001).

A dosagem IFN- γ é um teste *in vitro*, portanto, tem a vantagem de não interferir no estado imune do animal, podendo ser repetido quantas vezes for necessário, pois não é preciso esperar o período de dessensibilização (WOOD; JONES, 2001).

Segundo os autores, Wood e Jones (2001), desde 1988, um teste de detecção de interferon gama comercializado com o nome de BOVIGAM tem sido amplamente testado em mais de 200 mil bovinos no Brasil, Austrália, Irlanda, Irlanda do Norte, Itália, Nova Zelândia, Romênia, Espanha e EUA. Sua sensibilidade varia entre 81,8% e 100% para tuberculose

bovina e a especificidade entre 94% e 100%. Na Nova Zelândia o ensaio de IFN- γ é aplicado para confirmar casos inconclusivos e falsos negativos para tuberculose bovina em animais submetidos ao teste cervical comparativo.

No Brasil, em condições de campo com animais de rebanhos em risco de tuberculose, esse teste apresentou sensibilidade de 100%, superior à tuberculinização cervical simples (88,3%) (LILENBAUM et al., 1999b). No entanto, esse teste apresenta algumas limitações, como as interferências provocadas por testes recentes de tuberculinização nos animais, e pelo tempo entre a colheita do sangue e o cultivo com PPD. Outro fator relevante é o alto custo, já que é uma tecnologia importada (GORMLEY et al., 2004).

Em alguns países como Estados Unidos, Grã-Bretanha, Nova Zelândia, Irlanda e Áustria têm sido usado um teste ELISA que aponta percentuais de sensibilidade e especificidades superiores a maioria dos diagnósticos de tuberculose, tanto no seu uso individual, para diagnóstico primário, quanto para complementá-lo em casos de resultados inconclusivos do diagnóstico por teste cervical comparativo (TCC) (WATERS et al., 2011).

Farias (2009), em seus estudos comparando o TCC com um ELISA em 137 bovinos, obteve por meio da tuberculinização 38,68% de casos reagentes, enquanto que pelo diagnóstico ELISA diagnosticou 34,31% de animais reagentes. Nesse estudo, a sensibilidade e especificidade do ELISA foi calculada em 88,7 e 94,6% respectivamente.

No estado do Pará, Silva (2003) comparou um diagnóstico de ELISA indireto com a tuberculinização em um estudo com 264 animais em oito municípios diferentes. O percentual de animais positivos a tuberculinização foi de 34,3%, e ao ELISA foi de 81%, já no que se refere à sensibilidade e especificidade, no ELISA indireto foi de 81,4% e 92% respectivamente, não tendo sido encontradas diferenças significativas na sensibilidade e especificidade entre os métodos de diagnóstico. O autor concluiu ainda que o diagnóstico por meio do ELISA indireto pode ser recomendado para uma triagem no rebanho antes de testar cada animal com a tuberculinização ou quando é desejado um diagnóstico coletivo.

Souza (2013) realizou um estudo com 164 bovinos, submetendo-os ao teste cervical comparativo, o resultado foi de 41 (25%) animais positivos, 29 (17,68%) inconclusivos e 94 (57,32%) negativos. Nesse mesmo estudo, o ensaio sorológico de IDEXX ELISA *M. bovis* identificou 2,5% (1/40) de positivo entre os animais reagentes ao TCC. Com sensibilidade de 2,5%, demonstrou índices baixos quando comparados a Lilenbaum et al. (1999a) - 86,74%, Delgado e González (2000) - 69,81%, Silva (2001) - 47% e Fraguás et al. (2008) - 34,02%. Entretanto, o ELISA IDEXX *M. bovis* foi utilizado somente nos animais cujos resultados

foram positivos ao TCC e como o próprio autor sugere a possibilidade de existir animais positivos dentre os 94 considerados negativos ao TCC não pode ser descartado.

O IDEXX ELISA *M. bovis*² é um ensaio multiplex que pode, simultaneamente, detectar e analisar a resposta a múltiplos antígenos marcados em um poço único num formato de matriz de 96 poços da placa. O mesmo demonstrou-se como um avanço no poder de diagnóstico com uma abordagem de múltiplos antígenos sobre a dos métodos padrão da indústria (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Em estudos realizados nos Estados Unidos, Grã-Bretanha, Nova Zelândia, Irlanda e Áustria, com bovinos infectados experimentalmente (incluindo *M. bovis* e *Mycobacterium* spp não tuberculosas), os anticorpos foram detectados pelo IDEXX ELISA *M. bovis* logo após a infecção, mais precocemente do que a tuberculinização. Obteve-se uma média de 63,6% de sensibilidade do teste ELISA, sendo que o mesmo teve seu maior percentual de sensibilidade em um rebanho da Irlanda quando atingiu 96,7% de sensibilidade e o seu menor em um pequeno rebanho de Michigan com apenas 30% (WATERS et al, 2011). Contudo os autores sugerem que o kit possa ser utilizado para o monitoramento rotineiro do agente nos rebanhos, especialmente nas regiões em que os testes tuberculinicos não sejam factíveis.

Na avaliação da especificidade do IDEXX ELISA *M. bovis* nesse mesmo estudo, obteve-se uma média de 98,4%, mostrando um percentual de 100% em boa parte dos rebanhos e um percentual mínimo de 92,4% em um rebanho na Pensilvânia. Não houve qualquer reatividade cruzada com anticorpo de *M. Avium* subsp. *Paratuberculosis*, o que garantiu a ótima especificidade. A baixa sensibilidade observada em alguns rebanhos é atribuída ao pouco tempo entre a infecção e a colheita das amostras, ou seja, os níveis de anticorpos circulantes ainda eram muito baixos, mesmo assim, alguns animais diagnosticados como negativos para tuberculose pelos métodos de mensuração de interferon gama (Bovigam) e teste cervical comparativo, foram detectados pelo IDEXX ELISA *M. bovis*, demonstrando seu potencial como teste complementar (WATERS et al, 2011).

Lilenbaum e Fonseca (2006) utilizaram um ELISA para o diagnóstico de vacas tuberculosas em um programa de controle da doença, empregando o método como teste complementar, o que resultou em uma melhora dos resultados, mediante identificação dos animais anérgicos.

As situações mais adequadas para o uso do teste IDEXX ELISA *M. bovis* são assim pontuadas: nas transferências de um animal entre rebanhos, uma importante ferramenta de

² IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA.

vigilância sanitária (FARIAS, 2009); um método complementar ao teste cervical comparativo pontuando nesse caso o reforço proporcionado pelos PPD's que intensificam a resposta por anticorpos nos casos de animais infectados; como confirmatório para o abate; nos locais onde o monitoramento do rebanho para tuberculose é inviável por meio da tuberculinização seja pelo grande número de animais, seja pela dificuldade de acesso (WATERS et al., 2011; FRAGUÁS et al., 2008).



MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Realizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em um estudo analítico-descritivo com 400 animais zebrinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), fêmeas e com idade superior a 24 meses, criados em fazendas das mesorregiões do nordeste paraense e metropolitana de Belém.

Os animais eram pertencentes a cinco fazendas (Quadro 1) assim distribuídas: na mesorregião do nordeste paraense os municípios de Capitão Poço e Garrafão do Norte situados na microrregião Guamá e a cidade de São Francisco do Pará na microrregião Bragantina, e na mesorregião metropolitana de Belém os municípios de Castanhal e Santa Izabel pertencentes a microrregião de Castanhal. As colheitas foram realizadas no período de 13 de março a 04 de maio de 2013. Em todas as fazendas os animais eram vermifugados e vacinados contra febre aftosa, carbúnculo sintomático e brucelose.

FAZENDA	AMOSTRAGEM/ REBANHO (%)	MUNICÍPIO
1	80/1.300 (6,15%)	CAS TANHAL
2	80/600 (13,33%)	SÃO FRANCISCO DO PARÁ
3	80/700 (11,42%)	GARRAFÃO DO NORTE
4	80/2.500 (3,20%)	SANTA IZABEL
5	80/2.500 (3,20%)	CAPTÃO POÇO

Quadro 1. Caracterização dos locais do experimento e da amostragem em cada rebanho estudado de acordo com a fazenda e o município

3.2 COLHEITA DE SANGUE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram realizadas colheitas de amostras de todas as vacas do grupo experimental, sendo colhidos 10,0 mL de sangue por punção da veia jugular externa, sem garroteamento excessivo do vaso, utilizando-se tubos vacutainer siliconizados sem anticoagulante e devidamente identificados. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a uma velocidade de 3.000 G, sendo a seguir separadas por aspiração do soro, alíquotadas em microtubos tipo *ependorf* de 2 ml, identificados e acondicionados a -20 °C para posterior realização da prova sorológica (ELISA).

3.3 TESTES REALIZADOS

3.3.1 Teste *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA

O teste de ELISA⁵ seguiu o protocolo padronizado pelo fabricante consoante figura 1. Para realização dos testes foram utilizados dois poços das placas de microtitulação para o controle positivo, dois para o controle negativo e um poço em branco para referenciar a leitora de microplacas.

A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas *TP Reader Basic/Thermoplate*, em um comprimento de onda de 450nm a uma precisão de ± 2 nm e resolução de absorbância igual a 0,001A em uma precisão de $\pm 0,03$ A. Os resultados de densidade óptica (D.O.) fornecidos pela leitora foram anotados e utilizados para calcular a validação do teste e em seguida os resultados das amostras de acordo com as especificações do fabricante do Kit (Quadro 2).

Cálculo para validação dos diagnósticos de tuberculose	
Média do controle negativo	$CN_x = (CN1 + CN2)/2$
Média do controle positivo	$CP_x = (CP1 + CP2)/2$
Validação do teste	$CP_x \geq 0,300$ e $CN_x \leq 0,200$
Resultado das amostras (diagnóstico)	$A/P = (Amostra - CN_x)/CP_x - CN_x$
Interpretação dos resultados	
$A/P < 0,300$	Negativo
$A/P \geq 0,300$	Positivo

Quadro 2. Fórmulas utilizadas para calcular a validação do teste e diagnóstico de tuberculose e o resultado das análises das amostras

⁵ IDEXX *M. bovis* Ab Test Part Number: 99-27744 (5 plates/strips). ©2013 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

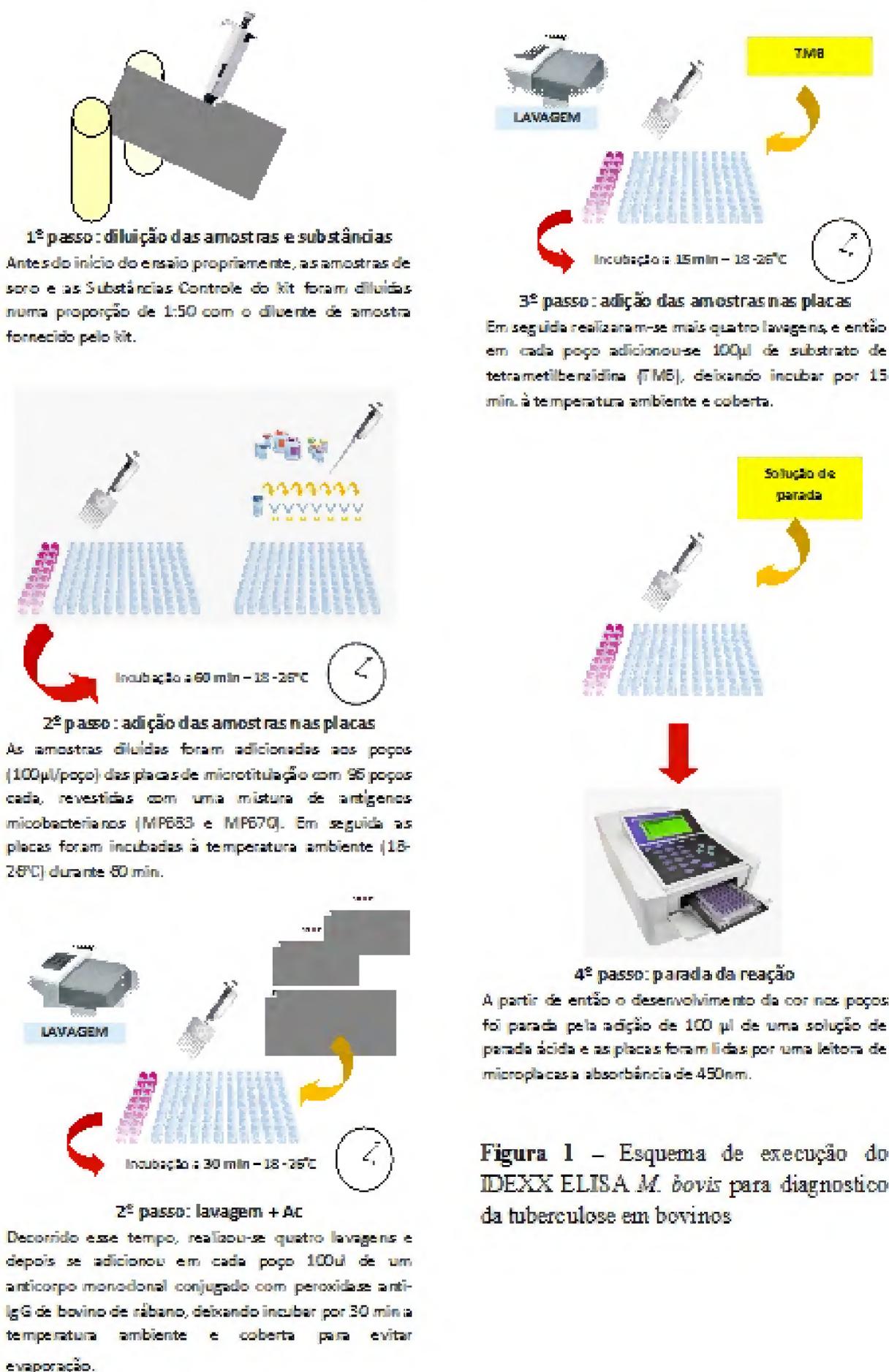


Figura 1 – Esquema de execução do IDEXX ELISA *M. bovis* para diagnóstico da tuberculose em bovinos

3.3.2 Teste cervical comparativo

No mesmo dia da colheita de sangue, as inoculações das tuberculinas PPD aviária (A) e bovina (B) foram realizadas por via intradérmica, na dose de 0,1 mL na região cervical, em locais previamente demarcados por depilação, a uma distância de 15 a 20 cm entre as duas inoculações. O PPD aviário⁴ foi inoculado cranialmente e o PPD bovino⁵ caudalmente, de um mesmo lado de todos os 400 animais do rebanho a serem testados. As espessuras das dobras da pele, em ambos os pontos inoculados, foram determinadas antes da inoculação (B0 e A0) e depois de 72+6 horas da inoculação (B72 e A72).

O aumento da espessura da dobra da pele foi calculado da seguinte forma: B= B72 – B0 e A= A72 – A0. Posteriormente, calculou-se a diferença entre as duas inoculações, subtraindo-se B de A. Os resultados do teste comparativo foram interpretados de acordo com o quadro 3 (BRASIL, 2006).

O protocolo seguiu as normas preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – FNCEBT elaborado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA.

	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretação
$\Delta B < 2,0$	-	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	< 0	Negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	0,0 a 1,9	Negativo
$\Delta B > \Delta A$	2,0 a 3,9	Inconclusivo
$\Delta B > \Delta A$	$\geq 4,0$	Positivo

Quadro 3. Interpretação do teste de tuberculina cervical comparativo em bovinos de acordo com o Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (BRASIL, 2006).

⁴ Derivado proteico purificado obtida de cultura da amostra D4 de *Mycobacterium avium*, em meio sintético de Dorset & Henley modificado. A concentração protéica é de aproximadamente 0,5 mg/mL, sendo a potência biológica expressa em 2.500 UI por dose, padronizado por comparação com antígeno de referência. Sua preparação obedece a Técnica Internacional recomendada pelo MAPA. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. INSTITUTO BIOLÓGICO CNPJ 46384.400/0024-35. Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252 - 04014-002 - São Paulo - SP www.biologico.sp.gov.br jordao@biologico.sp.gov.br.

⁵ Obtida de cultura da amostra AN5 de *Mycobacterium bovis*, em meio sintético de Dorset & Henley modificado. A concentração protéica é de aproximadamente 1,0 mg/mL, sendo a potência biológica expressa em 3.250 UI por dose, padronizado por comparação com antígeno de referência. Sua preparação obedece a Técnica Internacional recomendada pelo MAPA. Dados do fabricante vêze nota 4.

3.4 DE TERMINAÇÃO DO ESTADO DA ARTE DA DOENÇA NO ESTADO DO PARÁ

Para determinação da prevalência da doença no estado do Pará, dados de notificação da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARÁ) foram coligidos nos anos de 2011 e 2012, sendo agrupados por Município e Mesorregião Geopolítica.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva dos dados, representada pelas frequências (%) de animais positivos ou negativos, tanto entre os referidos exames (ELISA e TESTE CERVICAL COMPARATIVO) como entre as diferentes fazendas (1, 2, 3, 4 e 5), foi obtida pelo procedimento *Freq* do programa SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

A estatística de inferência foi realizada como análise de variância (ANOVA), por meio do procedimento de análises mistas *Glimmix*, do programa SAS. Tendo em vista que os dois exames sempre foram realizados no mesmo animal, o modelo estatístico foi constituído pelas variáveis classificatórias EXAME e ANIMAL. A interação entre o tipo de exame realizado dentro de cada fazenda (EXAME*FAZENDA), a fim de observar algum possível efeito diferente entre os exames em cada uma das fazendas, também foi incluída no modelo. A comparação entre as frequências dos grupos foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means* (LSMeans) do SAS. Foi utilizado o nível de significância de 5%.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SITUAÇÃO DA TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DO PARÁ

Segundo dados da Agência de Defesa Agropecuária do Pará (ADEPARÁ) a notificação de casos de tuberculose no ano de 2011 (Tabela 1) foi de 0,34% (99/29.151) de animais positivos, enquanto que no ano de 2012 (Tabela 2) esse percentual aumentou para 0,69% (444/64.802). Apesar do expressivo crescimento em um ano, confirmando a fragilidade do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (FNCEBT) no estado, o percentual é inferior à prevalência média nacional que gira em torno de 1,3% (BRASIL, 2006).

Gormley e Collins (2000) destacaram uma prevalência da tuberculose na Irlanda bem superior (8,8%) aos dados aqui obtidos. Porém na Tanzânia, a prevalência em rebanhos de corte igual a 1,0% (SHIRIMA, 2003) foi similar aquela descritas no estado do Pará.

Resultados de prevalência para a tuberculose bovina bem inferiores àqueles do estado do Pará, foram descritos no estado do Mato Grosso entre os meses de novembro de 2004 e agosto de 2005 iguais a 0,05% de animais positivos (27/57.641) (SALAZAR, 2005). Do mesmo modo, nos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Goiás denota-se uma baixa prevalência de casos de tuberculose bovina com taxas iguais a 0,013% - 63/483.047 (ALMEIDA, 2004), 0,08% e 0,04% (BAPTISTA et al., 2004), respectivamente.

No Rio Grande do Sul, entre os anos de 2004 e 2008, na região de Pelotas, obteve-se uma prevalência de 0,28% de tuberculose (1.139/403.246) em bovinos abatidos (WÜRFELE et al., 2008), similar aquela descrita no ano de 2011 no estado do Pará.

Tabela 1. Casos de tuberculose diagnosticados pelo teste cervical simples ou da prega caudal no estado do Pará no ano de 2011 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA

Nº de Fazendas	Animais Amostrados	Casos Reagentes	Município	Mesorregião	Prevalência %
1	72	1	Atenquer		1,39
1	68	2	Atenquer		2,94
1	102	5	Atenquer		4,90
4	18	0	Atenquer		0,00
4	38	0	Atenquer		0,00
10	131	0	Atenquer		0,00
8	109	0	Atenquer		0,00
1	10	0	Atenquer		0,00
1	30	0	Atenquer		0,00
1	29	0	Atenquer		0,00
1	25	1	Praíha		4,00
1	45	1	Praíha		2,22
1	14	13	Praíha		92,86
1	45	0	Praíha		0,00
1	12	0	Praíha		0,00
1	6	1	Porto de Moz		16,67
1	25	13	Porto de Moz		52,00
1	28	1	Santarém		3,57
2	437	6	Santarém		1,37
1	24	0	Santarém	Baixo Amazonas	0,00
5	231	0	Santarém		0,00
2	430	0	Santarém		0,00
3	435	0	Santarém		0,00
2	605	0	Santarém		0,00
2	50	0	Santarém		0,00
13	420	0	Santarém		0,00
3	420	0	Santarém		0,00
1	57	0	Santarém		0,00
2	186	0	Santarém		0,00
3	76	19	Monte Alegre		25,00
1	10	0	Monte Alegre		0,00
2	20	0	Monte Alegre		0,00
2	10	0	Monte Alegre		0,00
4	20	0	Monte Alegre		0,00
2	23	0	Monte Alegre		0,00
2	24	0	Monte Alegre		0,00
2	15	0	Placas		0,00
1	26	0	Placas		0,00
5	85	20	Almeirim		24,10
1	6	0	Belterra		0,00
5	65	0	Abel Figueiredo	Sudeste Paraense	0,00
3	78	0	Abel Figueiredo		0,00
2	60	0	Abel Figueiredo		0,00
1	5	0	Abel Figueiredo		0,00

Tabela 1. Casos de tuberculose diagnosticados pelo teste cervical simples ou da prega caudal no estado do Pará no ano de 2011 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA. Continua...

Nº de Fazendas	Animais Amostrados	Casos Reagentes	Município	Mesorregião	Prevalência %
1	68	0	Abel Figueiredo		0,00
5	66	0	Abel Figueiredo		0,00
1	36	1	Parauapebas		2,78
5	194	0	Marabá		0,00
1	10	0	Marabá		0,00
1	6	0	Marabá		0,00
9	632	0	Marabá		0,00
14	954	0	Marabá		0,00
13	510	0	Marabá		0,00
13	980	0	Marabá		0,00
1	28	0	Marabá		0,00
1	35	0	Marabá		0,00
10	139	0	Dom Eliseu		0,00
2	47	0	Dom Eliseu		0,00
10	139	0	Dom Eliseu		0,00
4	71	0	Dom Eliseu		0,00
1	3	0	Dom Eliseu		0,00
10	268	1	Novo Repartimento		0,38
5	129	0	Novo Repartimento		0,00
6	146	0	Novo Repartimento		0,00
10	181	0	Novo Repartimento		0,00
7	233	0	Novo Repartimento	Sudeste Paraense	0,00
9	490	0	Novo Repartimento		0,00
1	50	0	Piçarra		0,00
2	24	0	Piçarra		0,00
15	41	0	Piçarra		0,00
1	109	0	Piçarra		0,00
1	15	0	Piçarra		0,00
1	1	0	Rio Maria		0,00
1	19	0	Rio Maria		0,00
1	42	0	Rio Maria		0,00
1	1	0	Rio Maria		0,00
1	16	0	Rio Maria		0,00
2	70	0	Rio Maria		0,00
2	70	0	Rio Maria		0,00
3	214	0	Rio Maria		0,00
4	73	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
2	24	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
13	176	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
5	83	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
3	1171	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
4	59	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
2	1171	0	São Geraldo do Araguaia		0,00

Tabela 1. Casos de tuberculose diagnosticados pelo teste cervical simples ou da prega caudal no estado do Pará no ano de 2011 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA. Continua...

Nº de Fazendas	Animais Amostrados	Casos Positivos	Município	Mesorregião	Prevalência %
2	203	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
2	104	0	Sapucaia		0,00
2	68 (jan/11)	0	Sapucaia	Sudeste Paraense	0,00
2	68(mai/11)	0	Sapucaia		0,00
2	80	0	Sapucaia		0,00
2	38(jan/11)	0	Castanhal		0,00
2	38(mai/11)	0	Castanhal		0,00
2	8	0	Castanhal		0,00
1	16	0	Castanhal		0,00
1	1	0	Castanhal		0,00
1	6	0	Capanema		0,00
1	10	0	Capanema		0,00
1	10	0	Capanema		0,00
1	2	0	Capanema		0,00
1	6	0	Primavera		0,00
1	6	0	Primavera		0,00
4	32	0	Tailândia	Nordeste Paraense	0,00
2	18	0	Tailândia		0,00
15	125	0	Tailândia		0,00
5	60	0	Tailândia		0,00
1	8	0	Tailândia		0,00
3	130	0	Tailândia		0,00
1	5	0	Tomé Açu		0,11
3	15	0	Tomé Açu		0,00
1	5	0	Tomé Açu		0,00
1	917	1	Ourém		6,71
15	1103	0	Ourém		0,00
15	1103	0	Ourém		0,00
1	149	10	Irituia		0,00
5	235	1	Altamira		0,43
2	31	0	Altamira		0,00
8	407	0	Altamira		0,00
11	408	0	Altamira		0,00
7	148	0	Altamira		0,00
1	9	0	Altamira		0,00
2	74	0	Altamira	Sudoeste Paraense	0,00
2	74	0	Altamira		0,00
15	823	0	Altamira		0,00
11	214	0	Brasil Novo		0,00
3	31	0	Brasil Novo		0,00
5	94	0	Brasil Novo		0,00
1	112	0	Brasil Novo		0,00
1	7	0	Brasil Novo		0,00

Tabela 1. Casos de tuberculose diagnosticados pelo teste cervical simples ou da prega caudal no estado do Pará no ano de 2011 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA. Conclusão

Nº de Fazendas	Animais Amostrados	Casos Positivos	Município	Mesorregião	Prevalência %
1	18	0	Brasil Novo		0,00
1	25	0	Brasil Novo		0,00
3	61	0	Itaituba		0,00
3	212	0	Itaituba		0,00
4	390	0	Itaituba		0,00
3	423	0	Itaituba		0,00
1	2	0	Itaituba		0,00
4	124	0	Itaituba		0,00
1	2	0	Itaituba		0,00
1	7	0	Itaituba		0,00
2	247	0	Itaituba		0,00
2	79	0	Medicilândia		0,00
1	7	0	Medicilândia		0,00
1	20	0	Medicilândia		0,00
2	144	0	Medicilândia		0,00
1	1	0	Medicilândia		0,00
2	144	0	Medicilândia		0,00
6	80	0	Trairão		0,00
1	12	0	Trairão		0,00
1	2	0	Trairão		0,00
3	123	0	Uruará	Sudoeste Paraense	0,00
2	21	0	Uruará		0,00
4	128	0	Uruará		0,00
1	1	0	Uruará		0,00
2	256(set/11)	0	Uruará		0,00
2	256(out/11)	0	Uruará		0,00
2	95	0	Uruará		0,00
1	25	0	Vitória do Xingu		0,00
1	11	0	Vitória do Xingu		0,00
3	28	0	Vitória do Xingu		0,00
3	120	0	Vitória do Xingu		0,00
1	4	0	Vitória do Xingu		0,00
1	24	0	Vitória do Xingu		0,00
1	27	0	Vitória do Xingu		0,00
1	54	2	Vitória do Xingu		3,70
33	1317	0	Novo Progresso		0,00
11	412	0	Novo Progresso		0,00
16	100	0	Novo Progresso		0,00
28	1315	0	Novo Progresso		0,00
32	1322	0	Novo Progresso		0,00
11	350	0	Novo Progresso		0,00
1	20	0	Novo Progresso		0,00
12	602	0	Novo Progresso		0,00
TOTAL	29.151	99			0,34

Tabela 2. Casos de tuberculose diagnosticados pelo teste cervical simples ou da prega caudal no estado do Pará no ano de 2012 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA

Nº de Fazendas	Animais Amostrados	Casos Positivos	Município	Mesorregião	Prevalência %
3	217	7	Monte Alegre		3,23
3	147	0	Monte Alegre		0,00
3	175	0	Monte Alegre		0,00
2	78	0	Monte Alegre		0,00
3	130	0	Monte Alegre		0,00
1	58	0	Monte Alegre		0,00
1	36	0	Monte Alegre		0,00
1	44	0	Atenquer		0,00
1	45	0	Atenquer		0,00
6	206	0	Atenquer		0,00
4	162	0	Atenquer		0,00
1	28	0	Atenquer		0,00
1	186	0	Atenquer		0,00
1	2	0	Belterra		0,00
2	199	0	Belterra		0,00
1	204	0	Placas		0,00
3	1069	0	Placas		0,00
3	1050	0	Placas		0,00
3	887	0	Placas	Baixo Amazonas	0,00
1	15	0	Placas		0,00
1	36	0	Praíha		0,00
2	8	4	Almeirim		50,00
1	12	2	Porto de Mox		16,67
3	788	28	Santarém		3,55
1	104	0	Santarém		0,00
1	17	0	Santarém		0,00
1	37	0	Santarém		0,00
1	29	0	Santarém		0,00
1	60	0	Santarém		0,00
1	23	0	Santarém		0,00
1	3	0	Santarém		0,00
4	502	36	Óbidos		7,17
4	134	5	Oriziminá		3,73
3	217	7	Monte Alegre		3,23
3	147	0	Monte Alegre		0,00
3	175	0	Monte Alegre		0,00
2	78	0	Monte Alegre		0,00
3	130	0	Monte Alegre		0,00
6	645	1	Novo Repartimento		0,16
10	841	0	Novo Repartimento		0,00
2	57	0	Novo Repartimento	Sudeste Paraense	0,00
8	664	0	Novo Repartimento		0,00
7	753	0	Novo Repartimento		0,00
8	654	0	Novo Repartimento		0,00

Tabela 2. Casos de tuberculose diagnosticados pelo teste cervical simples ou da prega caudal no estado do Pará no ano de 2012 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA. Continua...

Nº de Fazendas	Animais Amostrados	Casos Positivos	Município	Mesorregião	Prevalência %
1	54	0	Novo Repartimento		0,00
1	19	0	Novo Repartimento		0,00
1	19	0	Novo Repartimento		0,00
1	15	0	Novo Repartimento		0,00
1	84	1	Rondon do Pará		1,19
1	47	1	Abel Figueiredo		2,13
2	112	0	Abel Figueiredo		0,00
2	125	0	Abel Figueiredo		0,00
2	130	0	Abel Figueiredo		0,00
1	7	0	Abel Figueiredo		0,00
1	14	0	Abel Figueiredo		0,00
1	23	0	Abel Figueiredo		0,00
2	52	0	Abel Figueiredo		0,00
1	2450	22	Parauapebas		0,90
1	234	0	Piçarra		0,00
1	226	0	Piçarra		0,00
1	297	0	Piçarra		0,00
1	245	0	Piçarra		0,00
1	15	0	Piçarra		0,00
1	18	0	Piçarra		0,00
1	2	0	Piçarra		0,00
1	53	0	Piçarra	Sudeste Paraense	0,00
1	4705	27	Curionópolis		0,57
2	4725	30	Curionópolis		0,63
2	4650	2	São João do Araguaia		0,04
1	21	2	Breu Branco		9,52
1	26	1	Goianésia		3,85
1	4443	27	Marabá		0,61
4	246	0	Marabá		0,00
2	97	0	Rio Maria		0,00
1	46	0	Rio Maria		0,00
4	592	0	Rio Maria		0,00
4	502	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
4	550	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
3	497	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
2	177	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
2	258	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
2	203	0	São Geraldo do Araguaia		0,00
1	77	0	Sapucaia		0,00
1	5	0	Sapucaia		0,00
1	63	0	Dom Eliseu		0,00
2	132	0	Dom Eliseu		0,00
1	38	0	Dom Eliseu		0,00
2	114	0	Dom Eliseu		0,00

Tabela 2. Casos de tuberculose diagnosticados pelo teste cervical simples ou da prega caudal no estado do Pará no ano de 2012 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA. Continua...

Nº de Fazendas	Animais Amostrados	Casos Positivos	Município	Mesorregião	Prevalência %
1	424	1	Garraão do Norte		0,24
2	4954	241	Inhangapi		4,86
1	155	3	São Francisco do Pará		1,94
2	17	2	Bonito		11,76
1	165	1	Castanhal		0,61
1	16	0	Castanhal		0,00
1	2	0	Castanhal		0,00
1	24	0	Tailândia		0,00
1	3	0	Tailândia		0,00
1	42	0	Tailândia	Nordeste Paraense	0,00
1	11	0	Tailândia		0,00
1	116	0	Tailândia		0,00
1	123	0	Tailândia		0,00
1	77	0	Tailândia		0,00
1	105	0	Tomé Açu		0,00
1	125	0	Tomé Açu		0,00
1	89	0	Tomé Açu		0,00
1	99	0	Tomé Açu		0,00
1	10(out/12)	0	Ourém		0,00
1	10(dez/12)	0	Ourém		0,00
3	510	0	Atamira		0,00
2	431	0	Atamira		0,00
2	140	0	Atamira		0,00
2	114	0	Atamira		0,00
2	138	0	Atamira		0,00
4	639	0	Atamira		0,00
3	569	0	Atamira		0,00
4	487	0	Atamira		0,00
1	78	0	Atamira		0,00
1	2	0	Atamira		0,00
4	743	0	Atamira		0,00
4	128	0	Atamira	Sudoeste Paraense	0,00
4	770	0	Atamira		0,00
2	95	0	Brasil Novo		0,00
1	17	0	Brasil Novo		0,00
1	18	0	Brasil Novo		0,00
1	16	0	Brasil Novo		0,00
2	95	0	Brasil Novo		0,00
1	40	0	Brasil Novo		0,00
2	190	0	Brasil Novo		0,00
3	362	0	Itaituba		0,00
2	124	0	Itaituba		0,00
2	235	0	Itaituba		0,00

Tabela 2. Casos de tuberculose diagnosticados pelo teste cervical simples ou da prega caudal no estado do Pará no ano de 2012 pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal – DDA. Conclusão

Nº de Fazendas	Animais Amostrados	Casos Positivos	Município	Mesorregião	Prevalência %
2	160	0	Itaituba		0,00
4	258	0	Itaituba		0,00
3	349	0	Itaituba		0,00
2	307	0	Itaituba		0,00
2	259	0	Itaituba		0,00
4	298	0	Itaituba		0,00
1	4	0	Itaituba		0,00
4	310	0	Itaituba		0,00
3	361	0	Itaituba		0,00
4	269	0	Itaituba		0,00
1	42	0	Itaituba		0,00
1	20	0	Medicilândia		0,00
3	100	0	Medicilândia	Sudoeste Paraense	0,00
5	299	0	Medicilândia		0,00
4	202	0	Medicilândia		0,00
2	179	0	Medicilândia		0,00
2	155	0	Medicilândia		0,00
2	165	0	Medicilândia		0,00
2	164	0	Medicilândia		0,00
2	102	0	Medicilândia		0,00
1	16	0	Medicilândia		0,00
1	129	0	Trairão		0,00
1	71	0	Trairão		0,00
2	139	0	Trairão		0,00
1	32	0	Trairão		0,00
2	127	0	Unurá		0,00
1	33	0	Unurá		0,00
TOTAL	64.802	444			0,69

Fonte: Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal, 2013.

Em outros estados do Brasil prevalências semelhantes àquelas descritas no estado do Pará também são observadas no município de Patos, estado da Paraíba (0,48%) (TABOSA et al., 2000) e no estado da Bahia cuja prevalência variou de 0,08% (8/6.889) a 0,66% (13/4.375) (COSTA, 2012) em duas diferentes regiões desse estado. Todavia, em Ilhéus/BA esses valores foram maiores (2,8%) (RIBEIRO et al., 2003) que àquelas descritas para o estado do Pará, em todos esses estudos o diagnóstico foi obtido pela identificação de lesões sugestivas de tuberculose bovina. Dados bem superiores àquelas observados no estado do Pará também foram apontados no estado do Maranhão, no município de Santa Rita com

12,12% (32/264) de vacas positivas para tuberculose, estas diagnosticadas pelo teste cervical comparativo (PEREIRA et al., 2009).

Entretanto, deve-se ressaltar que essa baixa prevalência de animais notificados no estado do Pará poderia, provavelmente, ser maior, visto que os animais foram examinados pelo teste cervical simples ou da prega caudal, que, sabidamente apresentam menores sensibilidade e especificidade em comparação com outros testes.

Isto torna evidente ao se confrontar os resultados de Lilenbaum et al. (1999a), em pesquisas realizados no Brasil, que descreveram percentuais de sensibilidade iguais a 87,7% e de especificidade iguais a 95,2% para o teste cervical simples, enquanto que Waters et al. (2011) obtiveram em um experimento na Irlanda, utilizando o IDEXX ELISA *M. bovis*, um percentual de sensibilidade de 96,7% e de 100% de especificidade.

Além disso, animais que ou estejam com quadros avançados da doença ou no início da infecção, ou imunodeprimidos, ou ainda fazendo uso de fármacos imunossupressores, e ainda nos casos de má conservação da tuberculina ou com prazo de validade vencido, também podem resultar em casos anérgicos, reduzindo a sensibilidade do exame (JORGE et al., 2004a).

A consequência desses resultados dada ao baixo poder de diagnósticos dos testes utilizados é o grande número de diagnósticos falso-negativos, permitindo que animais com tuberculose permaneçam disseminando o patógeno no rebanho, tornando cada vez mais frequentes os surtos da doença e mais difícil o controle e erradicação.

Observa-se que das mesorregiões do estado do Pará a que obteve maior prevalência da tuberculose no ano de 2011 foi a mesorregião do Baixo Amazonas (Figura 2). E a de menor prevalência para o mesmo ano foi a mesorregião do Sudeste Paraense.

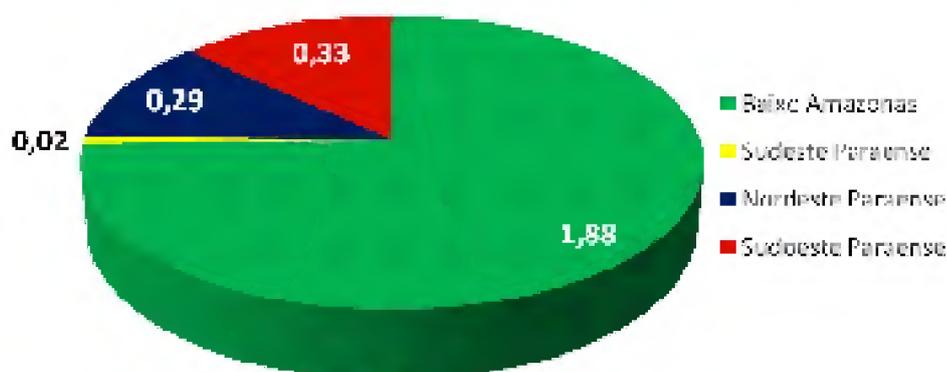


Figura 2. Distribuição da prevalência da tuberculose bovina, determinada pelo teste cervical simples ou da prega caudal, de acordo com a Mesorregião do estado do Pará, no ano de 2011

Já em 2012, a mesorregião do estado que obteve maior prevalência da tuberculose foi a do Nordeste Paraense (Figura 3). E a de menor prevalência neste mesmo ano foi a Mesorregião do Sudoeste Paraense.

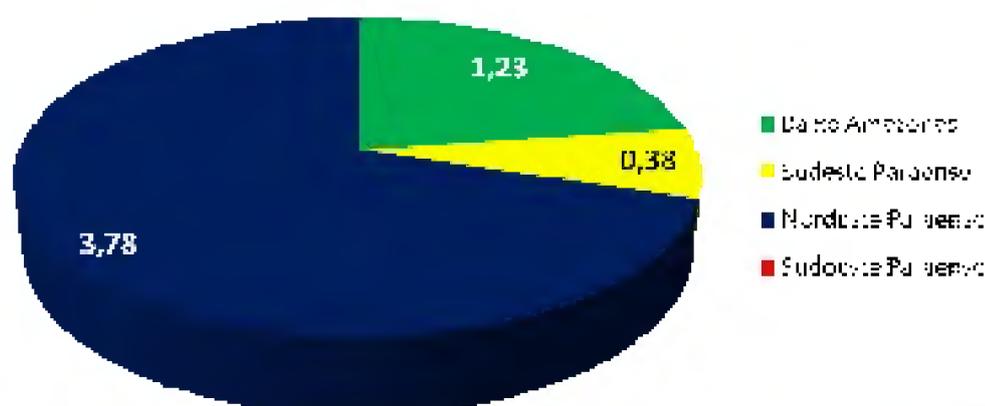


Figura 3. Distribuição da prevalência da tuberculose bovina, determinada pelo teste cervical simples ou da prega caudal, de acordo com a Mesorregião do estado do Pará, no ano de 2012

Vale destacar que a mesorregião do Nordeste Paraense passou de 0,29% em 2011 para 3,78% em 2012 (Tabela 2; Figuras 2 e 3), destacando-se, principalmente o surto da doença no município de Inhangapi, onde foi diagnosticada a enfermidade em 241 bovinos dos 4954 bovinos amostrados, além de diagnósticos positivos, porém em menor prevalência, em outros municípios como Garrafão do Norte, São Francisco do Pará, Bonito e Castanhal.

Dos 99 casos notificados de tuberculose no estado do Pará em 2011, 11 deles encontravam-se na Mesorregião do Nordeste Paraense. Em 2012 a incidência da enfermidade nessa mesorregião aumentou para 248 casos dos 444 animais diagnosticados por meio do teste cervical simples ou da prega caudal, demonstrando claramente que o agente nos dois últimos anos se disseminou nos rebanhos bovinos na Mesorregião do Nordeste Paraense.

Estes dados por regiões são bem distintos de resultados obtidos em outros estados como na Mesorregião do Sudoeste Paranaense, onde foram tomados como amostra quatro municípios, cuja prevalência foi de 0,098% entre os 13.214 animais examinados por meio do teste cervical simples (SABEDOT et al., 2004).

Esse fato não necessariamente pode ser atribuído a maior cobertura diagnóstica obtida pela ADEPARÁ por meio dos relatórios produzidos pelos médicos veterinários credenciados na região (sete municípios em 2011 e oito em 2012), visto que em outras mesorregiões (Sudeste Paraense), onde foram examinados animais de nove municípios em 2011 e quatorze

em 2012, a prevalência não aumentou. Ao contrário houve diminuição em alguns municípios como em Parauapebas (2,78% em 2011 para 0,90% em 2012).

Em outros estudos, também realizado no estado do Pará, na Mesorregião do Sudeste Paraense a prevalência variou de 1,34% (ALVIM et al., 2007) a 2,8% (RIBEIRO et al., 2003), dados bem distintos dos apresentados neste estudo para a mesma região (0,02% em 2011 e 0,38% em 2012). Tais resultados mostram uma efetiva diminuição prevalência da tuberculose na região, provavelmente em decorrência de um mais efetivo controle e profilaxia do agente nas fazendas dessa mesorregião do estado.

Vale ressaltar que outros municípios também apresentaram percentuais, mais elevados em 2011, a exemplo de Porto de Moz e Prainha na mesorregião do Baixo Amazonas, onde uma propriedade foi estudada em cada município com prevalências iguais a 52,00% e 92,86%, respectivamente. Em 2012, o Baixo Amazonas manteve elevados índices de prevalência da doença, como no município de Porto de Moz, com 16,67% dos animais amostrados positivos e em Almeirim, cujo percentual chegou a 50,00%. Porém, é importante destacar que o número de animais amostrados nessas fazendas era baixo (Tabelas 1 e 2).

Além dessas altas taxas da doença em algumas regiões e das discrepâncias da prevalência intra e inter-regiões, o que prejudica o fluxo na comercialização dos animais, é importante destacar o relativo percentual de casos inconclusivos obtidos pelo diagnóstico de teste cervical simples ou da prega caudal (Curionópolis em 2012 com 1,08% de diagnósticos inconclusivos), fator negativo tanto na acurácia do teste, como nas medidas sanitárias adotadas para controle da doença, visto que animais com diagnóstico de suspeição ou inconclusivo permanecem no rebanho, podendo ser potenciais disseminadores da doença, caso sejam verdadeiramente positivos. Estes dados são ainda mais preocupantes em outras regiões de outros estados fronteiriços ao estado do Pará, como no município de Santa Rita/MA (PEREIRA et al., 2009) com 6,06% (16/264) de reações inconclusivas.

4.2 UTILIZAÇÃO DO ELISA IDEXX *M. bovis* FRENTE AO TESTE CERVICAL COMPARATIVO PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA

A baixa prevalência obtida pelo teste cervical comparativo (TCC) no presente estudo (0,50%) esta dentro dos níveis de animais infectados descritos para o estado nos anos de 2011 e 2012 (0,34 – 0,69%). Todavia, ao se analisar a prevalência descrita ao se utilizar o ELISA

como método diagnóstico os valores (5,5%) são bem superiores aos obtidos no estado nos anos anteriores. Deve-se destacar que somente fazendas das mesorregiões do nordeste paraense e metropolitana de Belém foram estudadas, cuja prevalência nos anos de 2011 e 2012 variou de 0,29 a 3,78, respectivamente. Portanto, os valores observados com o teste cervical comparativo estão muito abaixo dos valores descritos para a região nos anos anteriores.

Dos municípios onde foi realizado o experimento (Castanhal, São Francisco do Pará, Garrafão do Norte, Santa Izabel e Capitão Poço) somente o município de Castanhal teve prevalência determinada pelos dados disponibilizados pela ADEPARÁ no ano de 2011 (0,0%). Já em 2012 foram estudados na amostragem fornecida pela referida agência os municípios de Garrafão do Norte (0,24), São Francisco do Pará (1,94) e Castanhal (0,00 a 0,61%). Percebe-se que as prevalências obtidas no presente estudo (Tabela 3) quando se utilizou o teste cervical comparativo são próximas daquelas descritas nos anos de 2011 e 2012 pela ADEPARÁ. Todavia, ao se utilizar o ELISA, essas prevalências foram visualmente maiores, demonstrando uma inconsistência de resultados em função do método utilizado (ELISA e teste cervical comparativo)

Essa menor incidência encontrada pela Agência de Defesa Agropecuária do Pará, pode estar relacionada ao método aplicado, o teste cervical simples ou o da prega caudal, cujos percentuais de sensibilidade são reconhecidamente inferiores às provas sorológicas como o ELISA multiplex (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

No experimento realizado na Fazenda 1 e 2 os resultados foram semelhantes quanto ao diagnóstico de teste cervical comparativo, dos 80 animais tuberculinizados, 1 bovino em cada uma delas teve resultado positivo, apesar destes não terem sido reagentes ao diagnóstico pelo ELISA multiplex, os demais se mostraram negativos para infecção por *M. bovis*. Já nas Fazendas 3, 4 e 5 todos os animais tiveram resultados negativos para tuberculose nesse método de diagnóstico, apesar de terem sido diagnosticados como reagentes pelo ELISA multiplex cinco animais na fazenda 3 e um em cada uma das fazendas 4 e 5 (Tabela 3). Os resultados obtidos pelo IDEXX ELISA *M. bovis* mostraram-se diferentes daqueles apontados pelo teste cervical comparativo, identificando 5,5% (22/400) de animais positivos para tuberculose.

Tabla 3. Resultado posicional do teste cervical comparativo e ELISA IDEXX M. Ávila para diagnóstico de tuberculose em bovinos da raça Nelore na Microrregião do Nordeste Paraense

RESULTADO	Fazenda										TOTAL	
	1 Castanhal		2 São Francisco		3 Garanhuns do Norte		4 Santa Isabel		5 Capitão Poço		TCC	ELISA
	TCC	ELISA	TCC	ELISA	TCC	ELISA	TCC	ELISA	TCC	ELISA		
Positiva	1,25% (1/80)	6,75% (5/80)	1,25% (1/80)	10,00% (8/80)	0,00% (0/80)	62,5% (5/80)	0,00% (0/80)	1,25% (1/80)	0,00% (0/80)	1,25% (1/80)	0,50% (2/400)	5,50% (22/400)
Negativa	98,75% (79/80)	93,25% (75/80)	98,75% (79/80)	90,00% (72/80)	100% (80/80)	37,5% (3/80)	100% (80/80)	98,75% (79/80)	100% (80/80)	98,75% (79/80)	99,50% (398/400)	94,50% (378/400)

TCC - teste cervical comparativo

Na Fazenda 1 foram diagnosticados sete animais positivos para tuberculose, o equivalente a 8,75% (7/80) da amostra pesquisada naquela propriedade; na Fazenda 2, oito animais deram resultados positivos, correspondentes a 10% dos animais examinados naquela propriedade; já na Fazenda 3, cinco casos positivos foram diagnosticados, o equivalente a 6,25% dos bovinos examinados; e nas Fazendas 4 e 5 apenas um caso positivo em cada, algo em torno de 1,25% da amostra pesquisada naquelas propriedades.

Deste modo, com porcentual de 5,5% (22/400) de positividade para tuberculose, o diagnóstico por ELISA aponta índices superiores aos obtidos pelo teste cervical comparativo (0,5%). Esses dados corroboram os estudos de Waters et al. (2011), que em um grupo de animais diagnosticados como negativos para tuberculose pelo teste cervical comparativo, 10% (2/10) foram detectados positivos pelo IDEXX ELISA *M. Bovis*, evidenciando, provavelmente uma maior acurácia do ELISA frente ao teste cervical comparativo.

Silva (2003) no estado do Pará obteve uma diferença ainda maior entre esses métodos diagnósticos, em que 34,3% de animais foram positivos ao teste cervical comparativo e 81% reagentes ao ELISA simples, corroborando os resultados deste estudo, que apontam uma diferença na sensibilidade do teste cervical comparativo frente ao ELISA.

Os maiores resultados obtidos por Silva (2003) podem ser justificados pela diferença entre os métodos diagnósticos aplicados, visto que Silva (2003) utilizou um ELISA simples, enquanto no presente estudo foi empregado um ELISA multiplex com maior especificidade (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006), diminuindo o número de animais falso positivos. Além disso, a maior ocorrência de casos positivos diagnosticados pode ser explicada pelo fato deste experimento ter trabalhado apenas com bovinos da raça Nelore, criados extensivamente e pertencentes ao Nordeste Paraense enquanto que Silva (2003) abrangeu, além de rebanhos bubalinos na Mesorregião do Nordeste Paraense, animais da Ilha de Marajó e do Médio Amazonas, onde a prevalência da tuberculose é maior em função das deficiências do manejo sanitário (PEREZ et al., 2002).

Diferindo dos resultados deste estudo, Souza (2013) ao submeter 164 bovinos ao teste cervical comparativo diagnosticou 25% (41/164) de animais reagentes e dentre estes, utilizou o IDEXX ELISA *M. bovis* em 40 deles, obtendo 2,5% (1/40) de índice de positividade. A discordância pode ser explicada pelo fato de que o ELISA IDEXX *M. bovis* foi utilizado somente nos animais cujos resultados foram positivos ao TCC, possivelmente deixando de identificar os animais falso negativos, não diagnosticados pelo teste cervical comparativo e passivos de detecção pelo ELISA multiplex (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006),

consoante a afirmação dos próprios autores ao ratificarem a informação da possibilidade de se ter animais positivos dentre os 94, considerados negativos ao TCC.

No presente estudo, o teste cervical comparativo deixou de diagnosticar os 22 animais positivos reagentes ao IDEXX ELISA *M. bovis*. Estes casos de animais não diagnosticados no TCC podem ser animais anérgicos, não responsivos ao alergoteste, porém diagnosticados como positivos no IDEXX ELISA *M. bovis*, favorecendo assim a condição de exame complementar do ELISA mediante identificação de animais anérgicos (LILENBAUM; FONSECA, 2006).

Lilenbaum et al. (1999a) e Fraguás et al. (2008), ambos utilizando um ELISA simples com PPD, descreveram prevalências para a tuberculose em bovinos de raças mestiças, iguais a 86,74%, e 34,02%, respectivamente. Dados estes bem maiores que as prevalências obtidas no presente estudo, ao utilizar o TCC (0,5%) e o ELISA (5,5%). Acredita-se que essas diferenças estejam relacionadas aos diferentes testes utilizados, uma vez que os mencionados autores adotaram um ELISA simples com placas impregnadas de diferentes tipos e porções antigênicas de *M. bovis*, o que resulta em uma especificidade inferior ao ELISA multiplex (IDEXX ELISA *M. bovis*) que consegue detectar e analisar múltiplos antígenos destacando aquele pesquisado, fato este que reduz os casos de falso positivos por infecção cruzada (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Além disso, o índice mais elevado, apontado no estudo de Lilenbaum et al. (1999a), pode ser justificado pelo fato de ter realizado seu experimento com bovinos de aptidão leiteira, onde os índices de tuberculose são reconhecidamente superiores aos rebanhos de corte (ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005), como os utilizados neste estudo.

Farias (2009) em estudos comparativos de diagnóstico de tuberculose com 137 bovinos, difere deste trabalho ao analisar o teste cervical comparativo e um ELISA simples, obtendo 38,68% (53/137) e 34,31% (47/137) de casos positivos nos respectivos métodos. Os maiores índices de animais positivos em ambos os métodos descritos por Farias (2009) possivelmente pode ser atribuído ao fato de que o autor realizou seu experimento com animais provenientes de propriedades do sul do Mato Grosso do Sul e onde se tinha conhecimento de casos confirmados de tuberculose, ao contrário das propriedades deste experimento cujos animais são oriundos de fazendas com eficiente controle sanitário e sem histórico da doença nos rebanhos.

4.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE CERVICAL COMPARATIVO FRENTE AO ELISA IDEXX *M. bovis* PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA

Seguindo a premissa de que o ELISA IDEXX *M. bovis*, com sensibilidade igual a 96,7% e 100% de especificidade (WATERS et al., 2011), é mais sensível e específico que o teste cervical comparativo, com sensibilidade e especificidade de 68,6% e 88,8% respectivamente (FRANCIS et al., 1978 apud ADAMS, 2001), adotou-se tal método como diagnóstico padrão para a tuberculose e calcularam-se a sensibilidade e especificidade do teste cervical comparativo (TCC) frente ao ELISA IDEXX *M. bovis* no presente estudo.

Observou-se que nenhum diagnóstico descrito como positivo pelo TCC foi verdadeiramente positivo, apontando dois diagnósticos falsos positivos e 22 falsos negativos considerados positivos ao ELISA IDEXX *M. bovis*.

No que se refere ao valor de sensibilidade, este foi considerado 0,00% (0/22), pois tendo um valor preditivo positivo igual a 0,00 nenhum animal diagnosticado como positivo pelo ELISA, foi também diagnosticado pelo teste cervical comparativo. Já em relação a especificidade, esta resultou em 99,47% (376/378), pois dos animais verdadeiramente negativos, o teste cervical comparativo deixou de reconhecer apenas dois deles.

No Brasil, um ELISA simples com PPD foi comparado ao teste cervical comparativo para detecção de animais infectados com *M. bovis*, sendo as sensibilidades iguais a 86,7% e 87,7%, respectivamente, e as especificidades iguais a 90,6% e 95,2%, respectivamente (LILENBAUM et al., 1999a). Diferentemente, os resultados alcançados no presente experimento não denotaram percentual de sensibilidade por parte do teste cervical comparativo, no entanto aponta uma especificidade de 99,47%, tão alta quanto a obtida por Lilenbaum et al. (1999a).

Uma possível causa de não haver significativa diferença na acurácia entre os exames, a exemplo do ocorrido neste estudo, pode estar no fato dos animais examinados apresentarem condições satisfatórias para a detecção pelo teste cervical comparativo, como ausência de anergia por terem sofrido um procedimento recente de tuberculinização, inferior a 60 dias (AAGAARD, 2006), e também estarem em condições favoráveis à detecção pelo ELISA, como nos casos de uma resposta humoral já formada, como ocorre com o avanço da enfermidade (RITACCO, 1991).

Além disso, os rebanhos estudados por Lilenbaum et al. (1999a) eram oriundos de propriedades com bovinos de aptidão leiteira, conseqüentemente as chances de manifestar os

níveis de sensibilidade são maiores devido a alta casuística da tuberculose nesses rebanhos, diferente dos rebanhos com aptidão para corte examinados neste estudo. Quanto à alta especificidade, confirma-se o poder de diagnóstico dos animais verdadeiramente negativos para a tuberculose por parte do teste cervical comparativo, destacando-se como um bom exame para o diagnóstico da *M. bovis*.

Diferente dos resultados obtidos neste experimento, Silva (2003), em um estudo comparativo entre um ELISA simples indireto e o teste cervical comparativo, não obteve diferenças percentuais significativas entre os testes, referindo sensibilidade de 81,4% para teste cervical comparativo, superior a encontrada neste estudo, e especificidade de 92%, similar aquela obtida para o mesmo teste no presente trabalho.

A maior sensibilidade do teste cervical comparativo obtido por Silva (2003), frente ao apresentando neste estudo, pode ser explicada pela diferença entre as mesorregiões onde foram aplicados os experimentos, pois na mesorregião do médio amazonas e da Ilha de Marajó, as prevalências da tuberculose são significativamente superiores as mesorregiões onde foi desenvolvido o presente estudo, o nordeste paraense e a mesorregião metropolitana de Belém (PEREZ et al., 2002). Devido a uma maior prevalência do agente nessas regiões os animais estão mais suscetíveis à infecção, com uma possibilidade do teste cervical comparativo ser aplicado em animais positivos e em condições que favoreçam a intradermoreação adequada são maiores, reduzindo as chances de não expressar a sensibilidade como ocorrido neste experimento.

É importante destacar que uma baixa sensibilidade do teste permite que animais positivos, mas não responsivos a intradermoreação pelos diversos fatores que levam ao anergismo frente às tuberculinas, não sejam diagnosticados pelo teste (JORGE et al., 2004a). A gravidade disso consiste no fato de se manter animais positivos no rebanho, considerados falso negativos nos testes pouco sensíveis, os quais favorecem a disseminação do agente nos rebanhos, tornando cada vez mais frequentes os surtos da doença e mais difícil o controle e erradicação.



CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos no presente estudo pode-se inferir que a tuberculose bovina é uma doença presente nos rebanhos paraenses nas mesorregiões do nordeste paraense, metropolitana de Belém, baixo amazonas, sudeste paraense e sudoeste paraense. Tal fato denota a necessidade de uma constante vigilância sanitária no trânsito de bovinos e adoção de medidas de controle e profilaxia da doença a partir de métodos diagnósticos complementares aos preconizados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (teste cervical simples e da prega caudal), buscando assegurar alta sensibilidade e especificidade na identificação do agente etiológico da tuberculose bovina.

Ainda foi possível concluir que o teste cervical comparativo quando confrontado com o ELISA multiplex, apresenta uma baixa sensibilidade, não sendo capaz de identificar os animais positivos do rebanho, fato este muito grave, visto que animais positivos, diagnosticados como falso negativos são fontes permanentes de infecção e disseminação do agente etiológico no rebanho.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, C. M.; GOVAERTS, V.; MEIKLE, A. J.; VALLECILLO, J. A.; GUTIERREZ-PABELLO, F.; SUAREZ-GÜEMES, J.; MCNAIR, A.; CATALDI, C.; ESPITIA, P.; ANDERSEN; POLLOCK, J. M. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* v. 44, p. 4326-4335, 2006.
- ABALOS, P.; RETAMAL, P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? *Rev. sci. tech off int Epiz.* v. 23, n. 2, p. 583-594, 2004.
- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*; v. 10, n. 2, p. 1 – 17, 2005.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Parte I: Bacteriosis – Tuberculosis zoonótica. *Organization Mundial de la Salud*. 2ª edición. p. 174-185. 2003.
- ADAMS, L. G. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 20, n. 1, p. 304-324, 2001.
- ADEPARA. Agência de Defesa Agropecuária do Pará/Departamento de Defesa Animal - DDA. 2013.
- ALMEIDA, R. F. C. Investigação de focos de tuberculose bovina em rebanhos de corte a partir de lesões sugestivas ao abate no estado de Mato Grosso do Sul. 2004. 52p. UFMS. *Dissertação*. Mestrado-Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2004.
- ALVIM, N. C.; BERMEJO, V. J.; PINHEIRO JÚNIOR, O. A.; FILADELPHO, A. L. Incidência e destino de carcaças de bovinos acometidos por brucelose e tuberculose no município de São Felix do Xingu-PA no período de outubro de 2003 a maio de 2004. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* - ano IV, número, 08, janeiro de 2007.
- AMADORI, M.; TAMENI, S.; SCACCAGLIA, P.; CAVIRANI, S.; ARCHETTI, I. L.; GIANDOMENICO, R. Q. Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis*-infected bovine herds. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 566-568, 1998.
- AMADORI, M.; LYASHCHENKO, M. L.; GENNARO, J. M.; ZERBINI, I. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* v. 85, p. 379-389, 2002.
- AMANFU, W. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberculosis* v. 86, p. 330-335, 2006.

ARANAZ, A. L.; DE JUAN, J.; BEZOS, J.; ÁLVAREZ, B.; ROMERO, F.; LOZANO, J. L.; PARAMIO, J.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, A.; MATEOS, L. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. para tuberculosis. *Vet. Res.* v.37, p. 593-606, 2006.

ARAÚJO, C. P.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K. A.; JORGE, K. S. G.; OSÓRIO, A. L. A. R. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 749-752, 2005.

ASSEGED, B.; LÜBKE-BECKER, A.; LEMMA, E. Bovine tuberculosis: a cross sectional and epidemiological study in and around Addis Abbaba. *Bull. Anim Health Prod Afr.*, v. 48, p.71-80, 2000.

AUER, L. A. Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Australian Veterinary Journal*, v. 64, n. 6, p. 172-176, 1987.

BAPTISTA, F.; MOREIRA, E. C.; SANTOS, W. L. M.; NAVEDA, L. A. B. Prevalência da Tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 5, p. 577-580, 2004.

BELCHIOR, A. P. C. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. 55f. *Dissertação* (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001.

BENNEDSEN, J. The specificity of circulating antibodies in experimental infections with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* demonstrated by immunofluorescence. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, v. 76, n. 2, p. 245-258, 1969.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. *Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal*. Brasília, 2006.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

COLLINS, D. M. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81:97-102. 2001.

COSTA, L. B. Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no estado da Bahia. *Dissertação*. (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia. Bahia. 2012.

- COUSINS, D. V.; FLORISSON, N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. Sci. Tech.* 24:1039-1059. 2005.
- CRETELLA, R. V.; MARTINS, R. L. G.; PINHEIRO JR, O. A. Incidência e destino da carcaça de bovinos acometidos por tuberculose na região Centro Oeste Paulista no período de Julho a Dezembro de 2004. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. ISSN 1679-7353. Ano III, n. 06, Jan. 2006.
- DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A. T.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; CHRISTIANSEN, K. H.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81:190-210. 2006.
- DELGADO, A. C.; GONZÁLES, A. S. Evaluación de la prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Rev. Invest. Vet. Perú*, v. 11, n. 2, p. 132-139, 2000.
- DE VOS, V.; BENGIS, R. G.; KRIEK, N. P.; MICHEL, A.; KEET, D. F.; RAATH, J. P.; HÜCHZERMEYER, H. F. The epidemiology of tuberculosis in free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 68:119-130. 2001.
- ELIAS, K.; HUSSEIN, D.; ASSEGED, B.; WONDWOSSEN, T.; GEBEYEHU, M. States of bovine tuberculosis in Addis Abada dairy farms. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.*; 27 (3): 915 – 923. 2008.
- FARIAS, T. A. Diagnóstico da tuberculose bovina por ELISA com proteínas recombinantes. *Dissertação*. Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009.
- FLORES, C.; DELGADO A.; GONZÁLEZ A.; RIVERA G. Determinación de la presencia de tuberculosis bovina en la provincia de Canta, Lima – Peru. *Revista Investigación Veterinaria de Peru*; 16 (1): 65 – 70. 2005.
- FRAGUÁS, S. A.; CUNHA-ABREU, M. S.; FERREIRA, A. M. R.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W.; FONSECA, L. S.; FERREIRA, R.; LILENBAUM, W. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina e animais reagentes à tuberculinização. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*. V.15, n.3, p.117-121, 2008.
- FRANCIS, J.; SEILER, R. J.; WILKIE, I. W.; O'BOYLE, D.; LUMSDEN, M. J.; FROST, A. J. The sensitivity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Veterinary Record* v.4, 1978.
- GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*, v. 81, p. 71-77, 2001.
- GORMLEY, E.; COLLINS, J. D. The development of wildlife control strategies for eradication of tuberculosis in cattle in Ireland. *Tubercle and Lung Disease*, v. 80, n. 4-5, p. 229-236, 2000.

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.* 28:413-420. 2004.

IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. Efetivo dos rebanhos e variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2010-2011. 2012.

JORGE, K. S. G. Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul. 73f. *Dissertação* (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2001.

JORGE, K. S. G.; ALMEIDA, R. F. C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; OSÓRIO, A. L. A. Tuberculose bovina: epidemiologia e controle. In: ALMEIDA, R. F. C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R. Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico. *Brasília: Embrapa Informação Tecnológica*. 95p., p. 45-59. 2004a.

JORGE, K. S. G.; OSÓRIO, A. L. A.; ARAÚJO, F. R.; ALMEIDA, R. F. C. de; SOARES, C. O. Tuberculose bovina: diagnóstico. In: Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico. *Brasília: Embrapa Informação Tecnológica*, 95p., p. 61-80. 2004b.

LILENBAUM, W. Atualização em Tuberculose Bovina. Uma minirevisão. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 22, n. 4, p.145-151, 2000.

LILENBAUM, W., FONSECA, L. S. O Uso e ELISA como ferramenta complementar para o controle da tuberculose bovina no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 2, p. 256-261, 2006.

LILENBAUM, W.; SCETTINI, J. C.; FERREIRA, M. A. S.; SOUZA, G. N.; RIBEIRO, E. R.; MOREIRA, E. C.; FONSECA, L. S. Evaluation of na ELISA – PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Research in Veterinary Science*, v.66, p.191-195, 1999a.

LILENBAUM, W.; SCETTINI, J. C.; SOUZA, G. N.; RIBEIRO, E. R.; MOREIRA, E. C.; FONSECA, L. S. Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*, v. 46, n. 5, p. 353-358, 1999b.

LONYCH, L. I.; KYSEL'OV, I. E. M The development of a latex antigenic diagnostic agent for the serological determination of tuberculous infection. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, v. 59, n. 1, p. 60-65, 1997.

LYASHCHENKO, K. P.; SINGH, M.; COLANGELI, R.; GENNARO, M. L. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J. Immunol. Methods* 242:91-100. 2000.

MEDINA, E.; RYAN, L.; LACOURSE, R.; NORTH, R. J. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-

susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. *Tuberculosis*, v. 86, p. 20-27, 2006.

MICHEL, A. L.; BENGIS, R. G.; KEET, D. F.; HOFMEYR, M.; DE KLERK, L. M.; CROSS, P. C.; JOLLES, A. E.; COOPER, D.; WHYTE, I. J.; BUSS, P.; GODFROID, J. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: implications and challenges. *Vet. Microbiol.* 112:91-100. 2006.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J. The Tuberculin test. *Vet. Microbiol.* v. 40, n.1-2, p. 111-124, 1994.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1-2, p. 41-52, 1994.

NEILL, S. D.; SKUCE, R. A.; POLLOCK, J. M. Tuberculosis: new light from an old window. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 1261-1269, 2005.

OCEPEK, M.; PATE, M.; POLJAK, M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from Human to Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 7, p. 3555-3557, 2005.

OLIVEIRA, V.; FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S.; CARNEIRO, A. V.; JESUS, V. L. T.; ALVES P. A. M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro – Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008.

OMER, M. K.; SKJERVE, E.; WOLDCHIWET, Z.; HOLSTAD G. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in dairy farms in Asmara, Eritrea. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.33, n. 4, p. 295-303, 2001.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*, v. 112, p. 181-190, 2006.

PEREIRA, H. M.; SANTOS, H. P.; BEZERRA, D. C.; PEREIRA, D. P. Ocorrência da tuberculose em rebanho bovino de uma propriedade do município de Santa Rita, Maranhão, Brasil. *Ciência Animal Brasileira. Suplemento 1, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria*. 2009.

POLETTI, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções viricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, Rio Grande do Sul – Brasil. *Revista Ciência Rural*, 34 (2): 595 – 598. 2004.

PEREZ, A. M.; WARD, M. P.; TORRES, P.; RITACCO V. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, v.56, n. 1, p.63-74, 2002.

PLACKETT, P.; RIPPER, J.; CORNER, L. A.; SMALL, K.; DE WITTE, K.; MELVILLE, L.; HIDES, S.; WOOD, P. R. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 66, n. 1, p. 15-19, 1989.

- POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 163:115-127, 2002.
- RIBEIRO, A. R. P.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.55, n.1, p.120-122, 2003.
- RITACCO, V.; KANTOR, I. N.; BARRERA, L.; NADER, A.; BERNARDELLI, A.; TORREA, G.; ERRICO, F.; FLIESS, E. Assessment of the sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*, v. 34, n. 2, p. 119-125, 1987.
- RITACCO, V.; LOPEZ, B.; BARRERA, L.; TORREA, G.; NADER, A.; KANTOR, I. N.; FLIESS, E. Evaluation of four antigens for the detection of anti-*Mycobacterium bovis* antibodies by enzyme immunoassay. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 20, n. 2, p. 97-101, 1988.
- RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; DE KANTOR, I. N.; BARRERA, L.; ERRICO, F.; NADER, A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, v. 50, n. 3, p. 365-367, 1991.
- ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, n. 18, n.1, p. 101-108, 1997.
- SABEDOT, M. A.; BOETCHER, A. V.; POZZA, M. S. S.; BUSANELLO, M.; MARTINS, S. da C. Pesquisa de bacilo álcool ácido resistente em cortes histológico de lesões sugestiva de tuberculose em bovinos. *Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande*, 2004.
- SALAZAR, F. H. P. Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos do estado de Mato Grosso, Brasil, 2005, 68 f. *Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Núcleo de Ciências Veterinárias, Campo Grande*, 2005.
- SHIRIMA, G. M.; KAZWALA, R. R.; KAMBARAGE, D. M. Prevalence of bovine tuberculosis in cattle in different farming systems in the eastern zone of Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 57, p. 167-172, 2003.
- SILVA, E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 78, p. 111-117, 2001.
- SILVA, J. V. da. Avaliação do Elisa-PPD no diagnóstico da tuberculose bubalina em algumas regiões do estado do Pará. *Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém. Embrapa Amazônia Oriental*, 39f. 2003
- SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. Técnicas imunoenzimáticas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em medicina veterinária. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte*, 360p., p.145-178. 2001.

- SOUZA, M. A. Tuberculose Bovina: Diagnóstico Intradérmico e Exames Complementares em Propriedade de Exploração Leiteira. *Dissertação*. Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Uberlândia/Faculdade de Medicina Veterinária. 78f. 2013.
- SURUBALLI, O. P.; ROMANOWSKA, A.; SUGDEN, E. A.; TURCOTTE, C.; JOLLEY, M. E. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. *Veterinary Microbiology*, v. 87, n. 2, p. 149-157, 2002.
- TABOSA, I. M.; MEDEIROS, V. T.; DANTAS, G. M. G. A. F. M. VEIRA, J. M.; MEDEIROS, M. B. A.; AZEVEDO, E. O.; MELO, M. A.; ANDRADE, M. G.; SOUZA, S. B.; MEDEIROS, L. S.; RODRIGUES, R. D.; XAVIER, S. D. Ocorrência de Tuberculose em bovinos abatidos em matadouro municipal de Patos – PB – Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 7:61-62, 2000.
- TIZARD I R. *Imunologia Veterinária - Uma Introdução*. 6ª ed. Editora Roca, São Paulo. 531p. 2002.
- VALENTE, L. C. M.; VALE, S. M. L. R. *Análise espacial do uso de medidas sanitárias de controle da brucelose e tuberculose bovinas*. 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Apresentação oral-Evolução e estrutura da agropecuária no Brasil. Porto Alegre, 2009.
- VORDERMEIER, H. M.; CHAMBERS, M. A.; BUDDLE, B. M.; POLLOCK, J. M.; HEWINSON, R. G. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*, v. 171, p. 229-244, 2006.
- WATERS, W. R.; BUDDLE, B. M.; VORDERMEIER, H. M.; GORMLEY, E.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; BANNANTINE, J. P.; STABEL, J. R.; LINSKOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J. C. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in the Detection of Bovine Tuberculosis in Cattle. *Clin Vaccine Immunol*. Nov; v.18, p. 1882-1888. 2011.
- WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; WHIPPLE, D. L.; CARLSON, M. P.; NONNECKE, B. J. Diagnosis implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*. 10:960-966. 2003.
- WEDLOCK, D. N.; SKINNER M. A.; LISLE, G. W.; BUDDLE, B. M. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microb. Infect.*, v.4, n.4, p. 471-480, 2002.
- WOOD, P. R.; JONES, S. L. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh)* 81:147-155. 2001.
- WÜRFEL, S. F. R.; ROSA, J. V.; PRATES, D. F.; LANSINI, V.; SILVA, W. P. Prevalência de tuberculose em matadouros-frigoríficos da região de Pelotas-RS no período de 2004 a 2008. Universidade Federal de Pelotas. *XVIII CIC. XI ENPOS/I Amostra Científica*. 2008.

YUGI, H.; NOZAKI, C. Serologic diagnosis of bovine tuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 33, n. 7, p. 1377-1384, 1972.