



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL



JOSÉ PEDRO DA SILVA NETO

**FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *MYCOBACTERIUM BOVIS* EM
REBANHOS LEITEIROS NAS REGIONAIS DE SÃO LUÍS, BACABAL E
PEDREIRAS – MARANHÃO**

São Luís

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

**FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *MYCOBACTERIUM BOVIS* EM
REBANHOS LEITEIROS NAS REGIONAIS DE SÃO LUÍS, BACABAL E PEDREIRAS
– MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

José Pedro da Silva Neto

Orientador: Prof. DSc. Prof.º Dr. Hamilton Pereira Santos

São Luís

2014

Silva Neto, José Pedro.

Frequência de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* em rebanhos leiteiros nas regionais de São Luís, Bacabal e Pedreiras - Maranhão / José Pedro Silva Neto.– São Luís, 2014.

59 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

1.Tuberculose. 2.*Mycobacterium bovis*. 3.Bovinos. 4.Maranhão.5.Elisa
I.Título

CDU: 636.2.034:616-002.5(812.1)

JOSÉ PEDRO DA SILVA NETO

**FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *MYCOBACTERIUM BOVIS* EM
REBANHOS LEITEIROS NAS REGIONAIS DE SÃO LUÍS, BACABAL E PEDREIRAS
– MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em ___/___/___ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. DSc. Prof.º Dr. Hamilton Pereira Santos
Orientador

Prof. DSc. Ferdinan Almeida Melo
1º membro

Prof. DSc. Helder de Moraes Pereira
2º Orientador

O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos desprezam a sabedoria e a instrução. O coração do entendido adquire conhecimento; e o ouvido dos sábios busca conhecimento. O que atenta prudentemente para a Palavra prosperará; e feliz é aquele que confia no Senhor.

Bíblia Sagrada: “Pv.1.7 ;Pv.18.15; Pv.16.20”

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Firmo Augusto da Silva e Mariete Leopoldina Bezerra, que me proporcionaram toda minha formação e, em especial a minha mãe a quem sempre tive como um exemplo de dedicação e determinação e que sempre foi um referencial para a minha formação acadêmica.

À minha esposa Avani Melo Costa e Silva e aos meus três filhos, Iale Miranda da Silva Bezerra, Iule Miranda da Silva Bezerra e Clidenor Furtado Leite Neto

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar Àquele que é Maravilhoso, Conselheiro, Deus Forte, Pai da Eternidade e o Príncipe da Paz, o Mesmo que colocou pessoas guiadas pelo seu Espírito para me ajudarem em mais esse desafio, pessoas que contribuíram decisivamente para um resultado satisfatório, e com quem preciso e quero dividir a maior parte do mérito por esse trabalho.

Agradeço à minha amada esposa Avani Melo Costa e Silva pelo seu apoio, amor e compreensão durante as horas difíceis enfrentadas no decorrer dos trabalhos.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram com essa jornada, às vezes com uma palavra de conforto e apoio ou contribuindo diretamente com as atividades que a pesquisa requer.

Agradeço ao amigo, Irmão em Cristo e colega de trabalho, Dr. Helvécio Santos Pereira, através de quem conheci o meu orientador, o Prof.º DSc. Hamilton Santos Pereira, a quem dedico uma gratidão especial, pois desde o início apostou em mim, mesmo diante de todas as dificuldades que foram aparecendo durante o curso e a pesquisa.

Agradeço ao INAGRO na pessoa do Dr. José de Jesus Reis Ataíde, que patrocinou a aquisição do KIT-ELISA, sem o qual esse trabalho não teria sido possível. Agradeço ao Prof.º DSc. Helder de Moraes Pereira pelo empenho durante o processo de aquisição do KIT ELISA, bem como, pelas suas orientações no tocante aos cálculos amostrais e redação desse trabalho.

Agradeço imensamente aos meus colegas de trabalho e de turma, a Dra. Adriana Prazeres e o Dr. Robert que compartilharam as amostras coletadas nas regionais onde a pesquisa foi realizada.

Meu sincero agradecimento aos alunos da graduação que participaram da realização dos testes. Agradeço especialmente à doutora Glenda Lima de Barros que contribuiu decisivamente para os bons resultados dos testes laboratoriais. Meus profundos agradecimentos e admiração à Doutora Lucia Maria Coelho Alves pelo apoio indescritível na fase final desse trabalho, para que obtivesse êxito.

Muito obrigado a todos

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Aspectos históricos da doença	16
3.2 Etiologia e imunopatogenia	20
3.3 Epidemiologia	24
3.3.1 Distribuição geográfica e Prevalência	24
3.3.2 Transmissão	25
4 DIAGNÓSTICO	27
4.1 Diagnóstico Clínico	28
4.2 Diagnóstico Anatomopatológico	28
4.3 Diagnóstico Bacteriológico	29
4.4 Diagnóstico Alérgico-cutâneo	30
4.5 Novos Métodos de Diagnóstico da Tuberculose Bovina	31
5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	33
6 IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA	34
7 CONTROLE	35
8 MATERIAL E MÉTODOS	36
8.1 Área de estudo e população	36
8.2 Amostragem	39
8.3 Seleção dos animais	40
8.4 Técnicas de Diagnóstico	41
8.4.1 Coleta de amostras	40
8.4.2 Princípio do Teste ELISA	42
8.4.3.1 Solução de lavagem	42
8.4.3.2 Amostras controle	42
8.4.3.3 Procedimentos de Teste	42
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

10 CONCLUSÃO.....	51
11 REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Distribuição amostral dos rebanhos de acordo com a regional e municípios submetidos ao teste ELISA Indireto para detecção de anticorpos de <i>M. bovis</i>	40
TABELA 2 Distribuição de animais reagentes ao teste Elisa Indireto para detecção de <i>Mycobacterium bovis</i> em rebanhos leiteiros do Maranhão, 2014	44
TABELA 3 Distribuição de animais reagentes e não reagentes ao teste ELISA Indireto para detecção de <i>Mycobacterium bovis</i> em rebanhos leiteiros por Regionais do Maranhão, 2014	46
TABELA 4 Distribuição dos animais reagentes e não reagentes por Municípios	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Mapa dos municípios que compõem a regional Bacabal –MA	37
FIGURA 2 Mapa dos municípios que compõem a regional de Pedreiras –MA	38
FIGURA 3 Mapa dos municípios que compõem a regional de São Luís – MA	39
FIGURA 4 Mapa dos municípios com animais reagentes na Regional de Pedreiras	48
FIGURA 5 Mapa dos municípios com animais reagentes na Regional de Bacabal- MA	49
FIGURA 6 Mapa dos municípios com animais reagentes na Regional de São Luís – MA	50

NETO,S.P J. Frequência de anti corpos contra *Mycobacterium bovis* em Rebanhos Leiteiros nas Regionais de São Luís, Bacabal e Pedreiras – Maranhão, São Luís ,2014.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo estimar a frequência de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* em rebanhos leiteiros no Estado do Maranhão. Foram coletadas, no período de maio a junho de 2013, 420(quatrocentos e vinte) amostras de sangue bovino em 70(setenta) rebanhos de 14(quatorze) municípios que compõem as regionais de São Luís, Bacabal e Pedreiras – MA. O teste sorológico empregado para o diagnóstico foi o ELISA Indireto que detectou uma frequência média de animais soro reagentes de 4,52 %, nos rebanhos estudados nas regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís. A partir do georreferenciamento dos municípios estudados foi possível analisar a distribuição espacial das áreas de foco da doença, onde na Regional de Pedreiras a frequência foi de 2,38% , de 5% na Regional de Bacabal e 16,67% na regional de São Luís. Mediante os resultados conclui-se que o teste de ELISA Indireto pode ser útil para o diagnóstico de infecções por *M. bovis* e uma alternativa para o diagnóstico em animais em estados avançados da doença. Também quando usado em animais negativos às provas de tuberculizações pode identificar animais anérgicos e possíveis reservatórios da tuberculose.

Palavras – chave: *Mycobacterium bovis*, frequência, bovino, Elisa, Maranhão.

ABSTRACT

The present study aimed to estimate the frequency of antibodies to *Mycobacterium bovis* in dairy herds in the state of Maranhão. In the period from May to June 2013 were collected 420 (four hundred and twenty) samples of bovine blood in 70 (seventy) herds of fourteen (14) municipalities that make up the São Luís regional Bacabal and Pedreiras - MA. The serological test used for diagnosis was the Indirect ELISA detected an average frequency of animal serum reagents of 4.52% in the herds in the Bacabal, Pedreiras and São Luís regional. Georeferenced The municipalities studied parse spatial distribution of the areas of focus of the disease, where the regional Quarries frequency was 2.38%, from 5% in regional Bacabal and 16.67% in the São Luís regional. Upon the results it is concluded that the test Indirect ELISA may be useful for the diagnosis of infections caused by *M. bovis* and an alternative for the diagnosis in animals in advanced stages of the disease. Also when used in the negative tuberculin testing of animals can identify anergic animals and possible reservoirs of tuberculosis.

Key – words: *Mycobacterium bovis*, frequency, cattle, Elisa, Maranhão.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país privilegiado no que se refere às condições para produção de proteínas de origem animal. Clima, solo, tecnologia e recursos humanos há muito deixaram de serem obstáculos e passaram a se constituir vantagens comparativas, que somadas à imensa extensão territorial, possibilitam ao país produzir proteína animal com preços competitivos, em quantidades crescentes e com a qualidade desejada pelos consumidores. O progresso ocorrido nas últimas três décadas, especialmente nos anos de 1990, nas áreas de formação de pastagem, produção e conservação de forragem, suplementação mineral, melhoramento genético, sanidade animal, abate, e processamento e comercialização da carne foram bastantes significativos para esta cadeia (FELÍCIO, 2001; SABADINI, 2009), contribuindo no grande desafio da economia mundial, que é enfrentar a fome. A produção de alimentos no Brasil está em ascensão, notadamente o segmento carne, e deve tornar o país no maior celeiro fornecedor de alimento do mundo nos próximos anos .

No que diz respeito à produção de leite, o Brasil é o quinto país colocado no cenário mundial e teve nos últimos 30 anos um aumento significativo na produção de leite, ao redor de 4%. Em 2003 foram produzidos 20,4 milhões de litros de leite, com estimativa de atingir 21,3 milhões em 2004, tendo participação de 4,3% do total da produção e respondendo com 66% do volume total de leite produzido no MERCOSUL.

No contexto socioeconômico Martins (2003) relata que no Brasil tem aproximadamente um milhão e cem mil propriedades produtoras de leite e corte, gerando mais de 3,6 milhões de empregos, superando dessa forma a construção civil, siderúrgica, têxtil e indústria automobilística.

Em decorrência da bovinocultura de leite ter um a pequena margem de lucro e alta concorrência interna e externa, os proprietários têm buscado as tecnologias, para aumentar a produção de leite e seus derivados, na aquisição de animais de alto valor genético, nutrição e da sanidade do rebanho (SILVA, 2001).

A introdução de animais geneticamente melhorados no rebanho tem como finalidade aprimorar os aspectos zootécnicos e econômicos, resultando em maior produção e produtividade. Porém no cruzamento entre raças os animais tornam-se mais exigentes e a baixa rusticidade e existência de sistema de produção semi-intensivo e intensivo, aliado a outros fatores de manejo, contribuem para o aparecimento de enfermidades infectocontagiosas, provocando forte impacto

negativo sobre a rentabilidade da pecuária mundial (DEL FAVA & PITUCO, 2003; FERNANDES, 2007).

Dentre as enfermidades animais destaca-se a tuberculose bovina, que é uma doença causada pelo *Mycobacterium bovis*, ocorre no mundo todo, mas que apresenta incidência reduzida em alguns países, como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e outros países da Europa. Além de se constituir em grave problema de saúde pública, os prejuízos causados por esta enfermidade representam significativas barreiras econômicas (BRASIL, 2006).

Os índices oficiais da tuberculose nacional referente ao período de 1989 a 1998 correspondem a 1,3% do rebanho, o que representa um número elevado, na ordem de 2,5 milhões de animais. Pesquisas confirmam que a infecção se concentra em bovinos leiteiros, mas principalmente naqueles rebanhos com algum grau de tecnificação, onde as taxas de infecção podem chegar a 15% de rebanhos com pelo menos um animal infectado (BRASIL, 2006).

O Estado do Maranhão está situado no Meio-Norte do Brasil, possui um efetivo bovino de aproximadamente 7.000.000 de cabeças com exploração de leite e carne. O crescimento da pecuária leiteira é abaixo da média nacional, com 3% anual e acúmulo de aproximadamente 25% na última década. Em 2010 o plantel de vacas de leite era de aproximadamente 680.000 (9,71%) das quais, foram ordenhadas aproximadamente 400.000 vacas com produção média de 1,5 L / vaca/dia, com 3.600.000 L / ano, o que denota um baixo nível de especialização desta atividade (ARAÚJO NETO, 2000; IBGE, 2006; INAGRO 2014).

As principais bacias leiteiras do estado do Maranhão estão concentradas nas regiões Tocantina e no Médio Mearim. A raça mais utilizada de gado leiteiro no Maranhão é a Girolanda, originada do cruzamento das raças gir e holandesa. A Girolanda é a raça responsável por 80% da produção de leite no Brasil

A bovinocultura no estado do Maranhão está em franca ascensão (INAGRO 2012), porém uma das principais causas de perdas na produção e produtividade são as enfermidades infectocontagiosas, com ênfase para tuberculose. Essas perdas são ocasionadas, em grande parte, pela falta de entrosamento e informações entre os diversos setores envolvidos nesta cadeia produtiva. Considerando que o *Mycobacterium bovis* acomete várias espécies animais e o homem, que tem grande importância por causar vultosas perdas econômicas para a pecuária e por seu impacto na saúde pública é que esta pesquisa foi idealizada.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar a frequência de anticorpos anti-*Mycobacterium bovis* na população bovina de produção leiteira nas regionais de São Luís, Bacabal e Pedreiras, Maranhão, Brasil.

2.2 Específicos

- Estimar a frequência de anticorpos contra o *M. bovis* pela técnica de ELISA INDIRETO (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).
- Realizar o georreferenciamento de focos em rebanhos leiteiros nas regionais de São Luís, Bacabal e Pedreiras.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos históricos da doença

No início do estudo sobre a doença acreditava-se que a domesticação do gado bovino, que ocorreu entre 10 mil e 25 mil anos atrás, teria permitido a passagem de um patógeno micobacteriano dos animais domésticos para os seres humanos. Em sua adaptação a um novo hospedeiro, a bactéria teria evoluído para uma espécie mais próxima de *Mycobacterium tuberculosis* (NEIL, 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. canetti* (BROSCH, 2002).

O *Mycobacterium bovis* já provocava, antes da ocupação humana, a tuberculose em animais das regiões que atualmente correspondem à Europa. No entanto, somente após o processo de domesticação dos bovídeos, ocorrido entre 8000-4000 a.C. é que surgem evidências arqueológicas de infecção humana por *M. bovis* através da observação de lesões tuberculosas em múmias de indivíduos que viveram durante o período neolítico, encontradas na Alemanha. A origem de tais lesões foi atribuída, provavelmente, à interação ambiental dos humanos com animais infectados e ao consumo de leite contaminado (DORMANDY, 2002; REICHMAN & TANNE, 2003).

Na África, algumas múmias dos Faraós da dinastia Ramsés, que reinaram há três mil anos antes da era cristã no Egito antigo, apresentaram sinais compatíveis com a tuberculose óssea. Na sociedade antiga, Hipócrates definiu a tuberculose como uma doença natural denominando-a de tísica, do grego *phthisis*, ou seja, que traz consumpção, devido ao esgotamento físico, frequentemente apresentado pelos indivíduos afetados. Posteriormente, Aristóteles também mencionou a ocorrência da doença na população grega, três séculos antes da era cristã. Na França e na Inglaterra, por volta do século XVI, pacientes com tuberculose ganglionar eram contemplados com o “toque real” pelos reis desses países, o que, muitas vezes era seguido de melhora dos sintomas, atribuindo-se tal efeito à assepsia do ambiente onde os doentes permaneciam aguardando o referido ritual. Também são antigos os relatos desta enfermidade em animais abatidos na comunidade judaica, ao ponto do *Talmud*, o livro sagrado dos judeus, proibir o consumo das

carcaças de animais que apresentassem lesões pulmonares, quando abatidos em matadouros ou submetidos ao sacrifício ritualístico sugerindo que os hebreus nos primórdios da era cristã, no século II, já conheciam as lesões presuntivas de tuberculose em ruminantes (MICHALANY, 1995; CORRÊA & CORRÊA, 1992; DORMANDY, 2002).

Nos séculos XVII e XVIII, com o início da exploração anatômica dos pulmões de humanos, François de la Boe identificou em pacientes mortos pela tísica, estruturas anormais que lembravam tubérculos, do latim *tuberculum* ou seja, nódulo, dando origem à terminologia *tuberculose*. No século XVIII, esta doença era conhecida por peste branca, citada brevemente por Giovanni Morgagni, pai da anatomia patológica, e descrita em detalhes por René Laennec (DUNLOP & WILLIANS, 1996; FERREIRA NETO & BERNARDI, 1997).

Em 1751, Fernando VI, Rei da Espanha criou uma lei que obrigava os médicos a notificarem todos os casos de tuberculose, afastando-se os doentes da comunidade, queimando-se todos os pertences dos pacientes que vinham a falecer. A partir de meados do século XVIII a Revolução Industrial na Inglaterra promoveu, além do desenvolvimento, uma grande expansão da pobreza que, associada às condições sanitárias ruins, favoreciam a disseminação de enfermidades, entre elas a tuberculose, que acometia quase metade da população inglesa. Apesar de toda esta história, a compreensão da doença só ocorreu a partir de 1810, quando Carmichael, um cientista inglês, observou que havia relação entre tuberculose nodular ou escrófula, em crianças, e consumo de leite de vaca pelas mesmas. Na época ele concluiu equivocadamente que a doença era desencadeada por fatores nutricionais (DUNLOP & WILLIANS, 1996; FERREIRA NETO & BERNARDI, 1997).

Entre 1865 e 1868, Jean Antoine Villemim demonstrou experimentalmente a transmissibilidade da tuberculose humana e de bovinos a coelhos e cobaias. Em 24 de março de 1882, Robert Koch, descobriu o agente infeccioso da tuberculose, corando-o pela fucsina-anilina e isolando-o em meio de cultura elaborado a partir de humor vítreo de bovinos de abatedouros, denominando-o, em 1884, *tuberkelbacillen* ou bacilo da tuberculose. Em 1885, Roentgen descobre o raio X, dando impulso aos estudos da enfermidade, método posteriormente desonerado no Brasil, quando Manoel de Abreu imprimiu as radiografias em filme de 35 milímetros, criando assim a abreugrafia (Grange & Yates, 1994; Michalany, 1995; Roxo, 1997).

Eufórico com sua descoberta, Koch tentou produzir uma vacina anti-tuberculose utilizando extrato glicérico de bacilos, ao qual denominou *old tuberculin*, ou tuberculina velha. Os

resultados foram ineficazes, mas a tentativa não foi em vão, permitindo-lhe a descoberta do fenômeno alérgico em pessoas que haviam tido contato prévio com o bacilo. Esta reação foi melhorada por Charles Mantoux em 1908, tornando-se universal (GRANGE & YATES, 1994; MICHALANY, 1995).

Em 1897, Theobald Smith, nos Estados Unidos da América (EUA), observando que o bacilo que acometia bovinos era menor, crescia mais lentamente *in vitro* e era menos sensível às modificações dos meios de cultura do que o bacilo que acometia humanos, levantou dúvidas sobre a teoria da existência de um único bacilo e descreveu a diferenciação entre os bacilos, denominando-os *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium* (PRITCHARD, 1988).

O século XIX foi, em função da tuberculose, de desalento para a sociedade contemporânea. A humanidade perdia precocemente seus ícones e cidadãos em geral. Como exemplo pode-se citar Frédéric Chopin, compositor clássico que, vitimado pela tuberculose, chegou a ser isolado em um monastério na ilha de Mallorca, onde compôs uma de suas mais belas obras, *Prelúdios*. Por volta de 1900, tantas eram as dúvidas acerca da doença, afetando tanto os humanos quanto os animais, principalmente com relação ao possível aspecto zoonótico da tuberculose bovina, que o governo inglês decidiu nomear uma comissão para estudar o assunto (PRITCHARD, 1988; DORMANDY, 2002).

Foi então criada a *Royal Commission on Tuberculosis*, que, ao invés de limitar-se às opiniões de especialistas, resolveu desenvolver um extenso programa de pesquisa, visando a geração de conhecimentos que esclarecessem definitivamente as dúvidas sobre a tuberculose em bovinos e sua relação com a doença em humanos. Essa Comissão trabalhou de 1901 a 1911, dispondo de um laboratório e uma fazenda experimental, e chegou à conclusão de que bovinos tuberculosos representavam risco para a saúde pública e que algo deveria ser feito, pois a ocorrência da doença nesses animais era em número alarmante (PRITCHARD, 1988; CORRÊA & CORRÊA, 1992).

A patogênese da enfermidade era ainda confusa, quando em 1917, Karl Ranke comparou o seu desenvolvimento com o da sífilis, determinando três períodos distintos, isto é, infecção primária, disseminação e lesão orgânica isolada. Posteriormente essa última forma, passou a ser denominada como tuberculose primária, a partir da qual poderia ocorrer evolução

para tuberculose de reativação endógena ou de reinfecção exógena (PRITCHARD, 1988; GRANGE & YATES, 1994).

Entre o fim do século XIX e início do século XX, a tuberculose acometia entre 20 e 40% dos bovinos de muitos países da Europa. A partir de então ficaram patentes os problemas sociais e econômicos decorrentes da doença e os países desenvolvidos iniciaram a implantação de programas para controle e erradicação. Após várias décadas, muitos países europeus, da Oceania e da América do Norte, alcançaram boa parte de seus objetivos, apresentando atualmente baixíssimas taxas de incidência e prevalência da tuberculose bovina (CORRÊA & CORRÊA, 1992; FERREIRA NETO & BERNARDI, 1997).

No Brasil em 1938, Torres e Pacheco isolaram o *Mycobacterium bovis* de lesões humanas, tratando-se da primeira publicação na literatura médica nacional sobre o assunto (SOUZA, 1999). Até 1970 o bacilo da tuberculose bovina era considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. A proposta para sua classificação como espécie individual denominada *Mycobacterium bovis* foi feita por Karlson & Lessel, em 1970 (FERREIRA NETO & BERNARDI, 1997). Quanto ao tratamento, até 1940 as pessoas tuberculosas eram tratadas como nos tempos passados, existindo informações inclusive da utilização de intervenções cirúrgicas, como no caso de ressecção do pulmão comprometido e de indução de pneumotórax com fins terapêuticos. Só em meados do século XX houve o incremento terapêutico através da utilização da estreptomicina, rifampicina e isoniazida, esta última descrita em 1912, a qual, em 1945 teve sua eficácia comprovada em laboratório, atuando sobre os ácidos micólicos da parede celular das micobactérias. A partir da década de 1960, até os dias atuais, foi preconizado o tratamento de humanos tuberculosos por meio da utilização de um coquetel com os antibióticos acima mencionados (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

No âmbito pecuário, a terapêutica ainda é discutível, pois a legislação sanitária da maioria dos países que alcançaram bons níveis de controle, não a preconizam, em contrapartida existem pesquisas indicando tratamento para bovinos em doses diárias e intervaladas utilizando principalmente a isoniazida (LANGENEGGER, 1991; CORRÊA & CORRÊA, 1992; MOTA, 2004).

Nos tempos atuais a recrudescência da tuberculose a configura como doença infecciosa humana que mais mata em todo o mundo, sobretudo em países em desenvolvimento da Ásia,

África e América Latina, os quais possuem respectivamente 94%, 82% e 60% de suas populações humanas em áreas rurais, correndo potencial risco de contrair esta zoonose. Deve-se considerar também o irrefutável aspecto de enfermidade ocupacional, quando trabalhadores envolvidos na cadeia produtiva da carne e do leite são expostos ao risco de contrair a infecção. Além destes fatores, também são consideráveis os prejuízos à bovinocultura, justificando a aplicação de medidas emergenciais de controle da enfermidade, preconizadas desde 1911 (COSIVE, 1998).

3.2 Etiologia e imunopatogenia

O agente etiológico da tuberculose bovina é a espécie *Mycobacterium bovis*, bactéria pertencente à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*, descrito por Robert Koch em 1882. Os patógenos mais importantes do gênero *Mycobacterium* pertencem ao complexo *M. tuberculosis*, que compreende: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum* e *M. canettii* e da cepa da vacina Bacilo Calmette-Guérin, conhecida por BCG (ETCHECHOURY, 2009). Novos membros do complexo *M. tuberculosis* são o *M. bovis* subsp. *caprae*, identificada na infecção de cabras na Espanha e seres humanos e gado na Europa Central (KUBICA, 2003), e *M. pinnipedii*, infectando focas na Austrália (COUSINS, 2003).

Os patógenos podem ser divididos em dois grandes grupos: um constituído pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*), outro compreendendo as espécies denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT), sendo descritas mais de cem espécies neste grupo (UEKI, 2005).

Morfologicamente os bacilos da espécie *M. bovis* são curtos, intracelulares facultativos, aeróbicos, imóveis, não esporulados, não flagelados, não capsulados e não produtores de toxinas. Apresenta-se em formato de bastonete reto, encurvado ou ramificado, medindo de 0,3 a 0,6 micrômetros (μm) por 1 a 4 μm . Têm como propriedade tintorial a álcool-ácido resistência, em função da capacidade de formar complexos com os derivados de trifenilmetano, resistindo à ação de álcool-ácido (TORTORA et al., 2005).

A tuberculose humana é causada principalmente por *M. tuberculosis*, no entanto, *M. bovis* o agente etiológico da tuberculose bovina, também pode ser responsável pela doença em seres humanos, o que torna esta bactéria uma espécie importante no aspecto zoonótico. A tuberculose transmitida de animais para seres humanos é clinicamente difícil de ser distinguida da doença causada por *M. tuberculosis* (IBRAHIM, 2012).

Os ruminantes são infectados por *M. bovis* geralmente pela via respiratória e ocasionalmente pela ingestão dos bacilos (CARTER, 1988; CORRÊA & CORRÊA, 1992; SMITH, 1993; RADOSTITS, 2002). A inalação do bacilo, pelo animal suscetível, através de perdigoto contendo gotículas, expiradas pelo animal infectado, responde por cerca de 90% das infecções.

Os mecanismos imunopatogênicos da infecção por *M. bovis* estão diretamente relacionados à composição da parede celular do bacilo, que é complexa e possui alta concentração de lipídeos, correspondendo a cerca de 20 a 40 % do peso seco do bacilo, conferindo-lhe resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos desinfetantes ácidos e alcalis. A imunopatogenia da tuberculose bovina, analisando a via de infecção mais comum que é a forma inalatória pode ser determinada por três fatores: o *primeiro* fator é a carga infectante, pois já foi comprovado experimentalmente que a doença pode ser reproduzida em bovinos com menos de 06 bacilos e em ovinos com 01 a 05 bacilos, que se introduzidos via respiratória, por aerossóis, produzirão lesão pulmonar, ao passo que 13 milhões de bacilos quando introduzidos via oral não produzem lesões. O *segundo fator* é a virulência do bacilo, que se refere à capacidade do micro-organismo causar infecção em determinado hospedeiro; o *terceiro* é a resistência ou imunidade natural do hospedeiro, aliada aos mecanismos de proteção das vias aéreas através das barreiras inespecíficas, além da imunidade adquirida, que pode ser humoral e principalmente celular, a qual envolve leucócitos, como os macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e linfócitos B, que interagem por meio de receptores ou por secreção de quimiocinas (MORRIS et al., 1994; NEILL et al., 1994; LAGE et al., 1998).

A resposta imune humoral ocorre quando os linfócitos T *helper* virgens (Th0) modulam-se em linfócitos T helper 2(Th2) expressando co-receptores CD8⁺ sensibilizados por quimiocinas tipo Interleucinas (IL) 4, 5, 6 e 10. Então, os linfócitos B (LyB) são acionados e modulam-se em plasmócitos produzindo anticorpos, os quais não são capazes de alcançarem o *M. bovis*, devido à sua localização intracelular, no fagossomo, caracterizando-se por uma resposta ineficiente. Este perfil de resposta favorece a instalação do quadro nosológico de anergia num estágio terminal, onde não há resposta citomediada, mas ocorrem altos níveis de anticorpos circulantes. Este quadro, apesar de não totalmente esclarecido, ocorre possivelmente mediado por quimiocinas tipo Interleucina-10 (IL10) e ausência de Interferon- gama (IFN-) (NEILL et al., 2001; POLLOCK & NEILL, 2002).

As moléculas de imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de aproximadamente 160k Da. São proteínas da fração de gamaglobulinas, sintetizadas por linfócitos B, capazes de reconhecer, precipitar ou neutraliza micro-organismos invasores ou proteínas estranhas (STEVENS & LOWE, 2001). De acordo com Tizard (2002), se dividem e se diferenciam em plasmócitos, secretando altas concentrações de anticorpos. A ligação dos anticorpos ao patógeno faz com que o mesmo seja neutralizado e, em seguida, lisado por enzimas do sistema complemento ou por fagócito (JANEWAY et al., 2007; ABBAS et al., 2008). Nos bovinos, estão identificadas e caracterizadas quatro frações de imunoglobulinas : IgG, IgM, IgA e IgE. As imunoglobulinas IgG podem ser divididas em duas subclasses, IgG1 e IgG2. As IgG1 são transportadas pela circulação para ser secretada via láctea, e se constitui a principal imunoglobulina para a imunização passiva de bezerros. Também é responsável pela fixação de complemento e sensibiliza a pele de bovinos. As IgG2 aparentemente são mais homogêneas que IgG1 e ocorrem em altas concentrações no soro bovino. IgM está presente no soro, colostro e leite e é importante na resposta imune primária, fixação de complemento e como um aglutinador de anticorpos no soro. A IgA bovina é secretada no leite e colostro (BUTLER, 1983; COLLARD et al. 1984).

As imunoglobulinas, quando separadas eletroforéticamente encontram-se distribuídas, principalmente, nas frações beta e gama globulinas do soro sanguíneo normal . Conhecendo-se as concentrações das proteínas séricas totais e da albumina, pode-se determinar, por diferença, o valor absoluto das globulinas. Pode-se ainda, estabelecer a relação albumina:globulina (SEVELIUS & ANDERSSON, 1995). A determinação das concentrações séricas de proteínas vem se tornando um procedimento valioso para o entendimento dos processos fisiopatológicos, sendo utilizada em animais sadios e doentes. Pesquisas têm evidenciado que a qualificação e a quantificação de proteínas séricas podem subsidiar o diagnóstico e trazer valiosas informações prognósticas e de monitoramento de doenças (ECKERSALL, 2000).

A produção de anticorpos também pode contribuir para a patogênese da tuberculose, formando complexos antígeno-anticorpo, os quais, ao ativarem o sistema complemento, podem causar lesão tecidual ou inibir o acesso de macrófagos ao sítio inflamatório, prejudicando a eliminação do *M. bovis* (HOPE et al., 2004).

Quanto à resposta imune mediada por células, esta ocorre quando macrófagos e células dendríticas ou células de Langerhans fagocitam e processam o *M. bovis* e apresentam os antígenos para os linfócitos modulados em T helper 1 (Th1), que expressam co-receptores CD4⁺

e liberam quimiocinas tipo Interleucina 12 (IL12), Interferon- gama (IFN-) e Fator de Necrose Tumoral-alfa e beta (TNF- e TNF-) que estimulam o recrutamento de outros macrófagos, linfócitos e fibroblastos. Este processo ocorre entre duas e dez semanas após o contato com o *M. bovis*, e é a resposta mais eficiente contra o bacilo. A consistência na modulação dos linfócitos T *helper* virgens (Tho) em Th1 ou Th2 é peculiar em cada animal, sendo detectado no sangue periférico de bovídeos tuberculosos quimiocinas IFN- de perfil Th1, e IL4 de perfil Th2, demonstrando que ambas as respostas ocorrem concomitantemente na infecção por *M. bovis* (NEILL et al., 2001; POLLOCK et al., 2001).

Muitos patógenos são destruídos quando fagocitados pelos macrófagos, evento que não ocorre com o *Mycobacterium bovis* e, na sua patogênese há multiplicação bacteriana intracelularmente dentro dos fagossomos, onde o *M. bovis* consegue executar vários processos a fim de postergar a fusão fagossomo-lisossomo, entre eles e o sequestro de íons Ferro, íon essencial para a sobrevivência intracelular do bacilo. Estes processos também são corroborados pela inibição da acidificação fagossomal (KAUFMANN, 2001; POLLOCK et al., 2001).

A despeito destes mecanismos, o *M. bovis* consegue reduzir sua atividade metabólica na falta de nutrientes e Oxigênio, podendo persistir no hospedeiro sem produzir enfermidade, em estado de latência. Então, os macrófagos conseguem desenvolver a maturação de alguns fagolisossomos digerindo e expressando antígenos peptídicos, glicolipídicos e lipoprotéicos do *M. bovis*, tornando-se células apresentadoras de antígenos ativadas, mediante estimulação por IFN-gama (KAUFMANN, 2001; ALBERTS et al., 2004). Os macrófagos ativados passam então a fagocitar e destruir os *M. bovis*, desencadeando assim uma complexa resposta imunológica (WEDLOCK et al., 2002).

Apesar do predomínio da resposta imune celular na tuberculose existem pesquisas elucidando a participação da resposta imune humoral. Segundo Lyashchenko et al. (1998), a resposta imune humoral de bovinos experimentalmente infectados envolve múltiplos antígenos que são reconhecidos pelos animais em diferentes estágios da doença. Nesse sentido, tem sido postulado que durante os estágios iniciais de infecções micobacterianas há predominância da resposta imune mediada por células; no entanto, com o progresso da doença pode ser observada uma alteração da relação de células T *helper* tipo 1 e 2 (Th1/Th2), que se associa a uma fase onde a produção de anticorpos é predominante (RITACCO et al., 1991).

Assim como a avaliação das frações globulínicas auxiliam o diagnóstico clínico, o conhecimento das imunoglobulinas de animais domésticos permitiu o desenvolvimento de testes sorológicos, como o teste de ELISA indireto, os quais se tornaram amplamente usados para diagnósticos e monitoramento de doenças infecciosas (CADMAN et al. 1994).

3.3 Epidemiologia

3.3.1 Distribuição geográfica e Prevalência

A enfermidade vem sendo alvo de intensas campanhas de erradicação e controle em vários países do mundo, desde a década de 50 e 60. No entanto, alguns países apresentam atualmente situação estável em relação à doença, enquanto em outras regiões do globo a prevalência é bastante alta. Na Europa, a enfermidade se encontra controlada em quase todos os países membros da Comunidade Européia (BENET, 1994). Países que iniciaram precocemente programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, baseado em ações sanitárias como a tuberculinização e sacrifício de animais infectados, erradicaram (Dinamarca, Holanda e Luxemburgo) ou reduziram (Alemanha, Bélgica, Inglaterra, França, Grécia e Portugal) a incidência da enfermidade (CAFFREY, 1994).

Nos Estados Unidos, embora a doença não possa mais ser considerada como problema sanitário, a erradicação completa da enfermidade ainda não foi atingida (ESSEY & KOLLER, 1994). Na África embora informações sobre a prevalência da enfermidade sejam bastante escassas, algumas comunicações sugerem que essa se encontra plenamente distribuída por todo o continente africano (DABORN, 1996).

Na América Latina e Caribe existem áreas com prevalência que ultrapassa 1%. No Brasil, estado de Minas Gerais, um estudo realizado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) em 1999, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou uma prevalência de 0,85% de animais reagentes ao teste de tuberculinização. No mesmo estudo, foram detectados 5% de propriedades com animais reagentes (BRASIL, 2006).

Ainda no estado de Minas Gerais foi realizado um estudo para avaliar a prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em 11 matadouros sob Inspeção Federal no ano de 1993 a 1997. Nesse período foram abatidos 954.640 bovinos, diagnosticados 681 casos de tuberculose e constatado uma prevalência de 0,8% (BAPTISTA, 2004).

No estado do Maranhão, Santos (1988) pesquisou tuberculose em 716 bovinos de exploração leiteira na Ilha de São Luís, mediante tuberculinização intradérmica cervical comparativa (TCC), sendo encontrada prevalência de 27,1%.

3.3.2 Transmissão

A transmissão natural é realizada nos bovinos de maneira direta ou indireta, assim como no homem. Na investigação anatomopatológica pode ser determinada a via de transmissão ao se descobrir a localização da lesão primária. O foco primário nos pulmões ocupa lugar de destaque na transmissão aerógena, por ser encontrado em 90% dos bovinos adultos com a doença. A transmissão por gotículas em suspensão, assim como a inspiração de pó veiculador com bacilos tuberculosos, desempenham importante papel, sobretudo na criação em estabulação (BEER, 1988).

Ainda que *M. bovis* sobreviva por vários meses no meio ambiente, a transmissão ocorre principalmente por aerossóis gerados por animais infectados. Os bovinos de leite, em particular, estão submetidos a maiores riscos porque os métodos de criação permitem o contato direto entre animais, tanto no momento da ordenha, como nos meses de confinamento durante o inverno. Os bezerros podem adquirir a infecção ao ingerir leite contaminado. Reservatórios silvestres de *M. bovis* são as principais vias de infecção para bovinos de pasto em alguns países (BEER, 1988; CORRÊA & CORRÊA, 1992; RADOSTITS, 2002).

A dose de *M. bovis* a qual bovinos são expostos pode ser altamente variável, devido a diferenças individuais do animal, cepa bacteriana e porta de entrada de inoculação (PALMER; WATERS, 2006). Possíveis vias de entrada para a infecção por *M. bovis* são respiratórias, digestórias, congênitas, cutâneas e venéreas. Na prática, a infecção nos bovinos em geral é adquirida quase exclusivamente pela via aerógena, pela inalação de gotículas infectadas de tosse ou secreção nasal de um animal com tuberculose pulmonar ativa (NEILL, 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, 1994); mas também pode ocorrer por deglutição do líquido amniótico infectado, que leva ao desenvolvimento de lesões nos intestinos ou nos linfonodos mesentéricos, como por inalação, que resulta em doença

pulmonar (HUCHZERMEYER, 1994). Em raras ocasiões, pode ocorrer transmissão genital da tuberculose nos bovinos, se houver lesões da infecção no pênis ou na mucosa prepucial dos machos ou ainda da vulva e ou mucosa vaginal das fêmeas (NEILL, 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, 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, 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 humana (O'REILLY; DABORN, 1995; ARAÚJO, 2005).

Formas pulmonares e extrapulmonares de tuberculose de origem animal continuam a ser um problema em áreas onde a prevalência da infecção nos bovinos é alta, porque nem todo leite consumido é fervido, muitos derivados são produzidos com leite não pasteurizado, e alguns casos de infecção são adquiridos via aerossol nos seres humanos em contato frequente com os animais doentes (PARDO, 2001; ACHA; SZYFRES, 2003). No entanto, bovinos não são a única fonte de *M. bovis*. Seres humanos têm sido infectados por contato com outros animais como alces, mamíferos marinhos e rinocerontes. Ainda, seres humanos com tuberculose ativa, devida à *M. bovis* podem infectar novamente os bovinos, principalmente em contato próximo pela via respiratória (GRANGE, 2001). A transmissão entre pessoas de *M. bovis* é possível, mas poucos casos têm sido confirmados, pois geralmente são hospedeiros acidentais e dependem de uma fonte animal (ACHA; SZYFRES, 2003). Além disso, comprovar tal transmissão é muito difícil, pois podem demorar muitos anos desde a infecção até o desenvolvimento da doença (GRANGE, 2001).

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

Doenças de disseminação aerógena, como a tuberculose são particularmente infectantes, tanto para bovinos, como para seres humanos, pois as pequenas gotículas geradas pela tosse não apenas transpassam as defesas do sistema respiratório superior, como permanecem no ar muito mais tempo que partículas maiores (SALYERS; DIXIE, 2002). Em infecções por via

aerógena, bactérias são inaladas no núcleo do aerossol. Apenas gotículas de 2-5 micrômetros de diâmetro têm a habilidade de alcançar os espaços alveolares dos pulmões, onde são depositadas e as bactérias existentes são fagocitadas pelos macrófagos. Partículas maiores são contidas no trato respiratório superior (PALMER; WATERS, 2006) e removidas pelo sistema mucociliar, sendo eliminadas posteriormente pelo trato gastrointestinal (HUCHZERMEYER, 1994). Outro aspecto comprovado é que a infecção pela via oral exige doses muito maiores (cerca de 10-20 milhões de bacilos), do que a requerida para via aerossol, na qual são necessários apenas 1 a 5 bacilos para causar a infecção (PALMER; WATERS, 2006).

4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico. Os indiretos pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral (produção de anticorpos circulantes) ou celular (mediada por linfócitos e macrófagos. A tuberculinização é uma medida da imunidade celular contra *M. bovis* por uma reação de hipersensibilidade retardada (tipo IV). A reação tuberculínica, a bacteriologia e a histopatologia são os métodos mais utilizados para o diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina. A grande inespecificidade dos sinais clínicos, a dificuldade de isolamento do *M. bovis* do animal vivo e os baixos níveis de anticorpos durante o período inicial de infecção fazem com que os diagnósticos clínico, bacteriológico e sorológico tenham um valor relativo. (MONAGHAN et al, 1994; SOUZA et al, 1999; MAPA, 2002)

O diagnóstico clínico, associado à tuberculinização possibilita a identificação de animais com tuberculose avançada, os quais geralmente apresentam um decréscimo da sensibilização alérgica, podendo, por vezes, chegar à anergia. Pode-se afirmar que existem métodos diagnósticos adequados para o desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina; entretanto, não existe um método diagnóstico da tuberculose bovina que tenha uma eficácia absoluta. A prova tuberculínica, a vigilância epidemiológica em matadouros, os controles sanitários, o diagnóstico de laboratório, são todos elementos básicos que devem ser empregados com critério e de modo adequado a cada situação epidemiológica. Independentemente dos métodos de diagnóstico utilizados, é fundamental que os animais positivos sejam abatidos,

evitando-se, assim, a disseminação da tuberculose. (CORREA & CORREA, 1992; MONAGHAN et al, 1994; SOUZA et al, 1999; MAPA, 2002)

4.1 Diagnóstico Clínico

Possui valor relativo, porque o animal pode estar infectado – com um foco localizado – e apresentar-se aparentemente sadio. O diagnóstico clínico torna-se importante para os animais com tuberculose avançada, para os quais o teste tuberculínico perde seu valor pela possibilidade do fenômeno da anergia à tuberculina. Os sinais clínicos mais frequentes são a caquexia progressiva e a tosse seca, curta e repetitiva. Animais tuberculosos, quando submetidos à marcha forçada, tendem a posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória. Pode ocorrer linfadenomegalia localizada ou generalizada. (CORREA & CORREA, 1992; MONAGHAN et al, 1994; SOUZA et al, 1999; MAPA, 2002)

4.2 Diagnóstico Anatomopatológico

A inspeção de carcaça ou a necropsia detalhada constituem importantes ferramentas no diagnóstico da tuberculose bovina. As lesões provocadas pelo *M. bovis* não são patognomônicas da tuberculose bovina. Apresentam coloração amarelada em bovinos e ligeiramente esbranquiçadas em búfalos. São nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro ou mais, que podem ser confluentes, de aspecto purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar necrose de caseificação no centro da lesão, ou, ainda, calcificação nos casos mais avançados. Em 70% a 90% dos casos, as lesões são encontradas em linfonodos de cabeça e tórax, e 66% dos animais necropsiados apresentam apenas uma única lesão visível. Em 95% dos casos, as lesões estão localizadas em linfonodos (mediastínicos, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais, inguinais superficiais e mesentéricos), pulmão e fígado. Com menor frequência, podem estar presentes em intestino e tecido mamário, ou em qualquer outro órgão ou tecido do animal. Animais reagentes ao teste tuberculínico podem não apresentar lesões visíveis a olho nu; isso não significa, porém, que se trata de reação falso-positiva. As lesões podem estar em estágios iniciais de evolução, ou simplesmente não terem sido encontradas pela necropsia. Fragmentos de tecido com lesões sugestivas de tuberculose (nódulos caseosos em linfonodos, pulmão, fígado, etc.) podem ser enviados para exame histopatológico em frasco de boca larga (plástico ou vidro),

hermeticamente fechado, imersos em solução de formaldeído a 10%, observando-se a proporção de uma parte de amostra para 10 de formaldeído.

4.3 Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico bacteriológico do *Mycobacterium bovis* é um método direto considerado como “padrão-ouro”. Porém, o longo período requerido para o isolamento e identificação bioquímica, é um de seus pontos críticos, podendo demandar mais de doze semanas para a conclusão definitiva do diagnóstico. No laboratório, os principais fatores que influenciam no sucesso do isolamento de *M. bovis* são a escolha do meio de cultura, os procedimentos de descontaminação da amostra e as condições de incubação do agente. *M. bovis* é uma bactéria que requer meios ricos em nutrientes para o seu crescimento e isolamento. Os meios de cultura de Stonebrink- Lesslie e Löwenstein-Jensen são à base de ovos e piruvato, e o primeiro é mais recomendado para o cultivo do *M. bovis*. Recomenda-se a semeadura concomitante nesses dois meios de cultura.

Conforme Souza et al., (1999) ; Manual do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (MPNCEBTP/ MAPA, 2002) o isolamento requer um longo período de incubação (30 a 90 dias), pois o *M. bovis* cresce lentamente em meios de cultura artificiais. As análises bacteriológicas completas são necessárias nas seguintes situações:

- confirmação da presença de infecção tuberculosa em bovinos de um país ou região onde não foi comprovada anteriormente;
- estudo de animais positivos ao teste tuberculínico, nos quais não se observaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Nesses casos, a pesquisa bacteriológica será feita especialmente em amostras de linfonodos do trato respiratório e intestinal;
- confirmação da presença de infecção em animais positivos ao teste tuberculínico, com ou sem lesões macroscópicas, de uma propriedade considerada livre de tuberculose;
- pesquisa de micobactérias em lesões sugestivas de tuberculose, encontradas durante a inspeção sanitária *post-mortem* de animais provenientes de unidades de criação monitoradas para tuberculose;
- pesquisa de micobactérias em amostras de leite e de outros produtos de origem animal;

- necropsias de animais com reações inespecíficas, nos quais são encontradas lesões sugestivas de tuberculose.

O diagnóstico também pode ser por exame direto de amostras frescas fixadas em lâmina e coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, para pesquisa de bacilos álcool ácido resistente (BAAR), contudo, a sensibilidade da baciloscopia é baixa e um resultado positivo sugere fortemente tratar-se de micobactéria, mas não informa a espécie. Essa mesma coloração pode ser empregada para colônias isoladas em meios de cultura. Muitas características, inclusive a propriedade tintorial, superpõem-se nos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia*, tornando difícil, em alguns casos, a diferenciação entre ambos (CORREA & CORREA, 1992, MAPA, 2002).

4.4 Diagnóstico Alérgico-cutâneo

O diagnóstico alérgico-cutâneo com tuberculina é o instrumento básico para programas de controle e erradicação da tuberculose bovina em todo o mundo. Pode revelar infecções incipientes a partir de 3 a 8 semanas da exposição ao *Mycobacterium*, alcançando boa sensibilidade e especificidade e sendo considerado pela OIE como técnica de referência. Para que realmente funcione como ferramenta diagnóstica em um programa de controle é indispensável que o procedimento seja padronizado quanto à produção das tuberculinas, equipamentos para realização das provas, tipos de provas e critérios de leitura (MAPA, 2002). Esse exame baseia-se na avaliação da resposta do animal à inoculação intradérmica de extratos de micobactérias denominados tuberculinas.

A tuberculina descoberta por Koch é, atualmente, denominada de derivado protéico purificado (PPD), composta de uma amostra AN5 de *M. bovis* (PPD bovino) e uma amostra D4 de *M. avium* (PPD aviário). Classicamente esta resposta é descrita como uma reação de hipersensibilidade tardia tipo IV, deflagrada em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose (MONAGHAN et al., 1994).

São preconizados testes diagnósticos de triagem e confirmatório da tuberculose bovina, representados pela prova intradérmica simples e pela comparativa. No primeiro caso utiliza-se somente PPD bovina em uma única inoculação, denominado teste cervical simples (TCS), ou na prega caudal, conhecido como teste da prega caudal (TPC). Como teste confirmatório

empregam-se PPDs bovino e aviário, inoculados simultaneamente em dois pontos próximos, previamente determinados na região do pescoço, denominado teste cervical comparativo (TCC). Após a tuberculinização, os animais reagentes tornam-se dessensibilizados, isto é, apresentam capacidade diminuída para responder a um novo teste alérgico, a qual é recuperada após um período de 42 a 60 dias (MONAGHAN et al.,1994).

Animais em estágio adiantado da doença podem desenvolver o fenômeno da anergia, que se caracteriza pela ausência de reatividade ao teste cutâneo tuberculínico, podendo ocasionar resultados falso-negativos interferindo no diagnóstico. Este fenômeno também pode ser observado em casos de infecção recente por *M. bovis*, entre 30 e 50 dias, final de gestação, parto recente, desnutrição e uso inadequado de drogas imunossupressoras. Além disso, variações inerentes ao teste, tais como dose de inóculo, cuidados com a armazenagem e conservação e a própria tuberculina utilizada, somadas às possíveis variações nos métodos de realização, critérios de leitura e formas de interpretação do teste, podem contribuir para o aumento da ocorrência de resultados falso-negativos (ROXO, 1997).

4.5 Novos Métodos de Diagnóstico da Tuberculose Bovina

Embora a resposta imune de infecções micobacterianas seja de natureza celular e, desta forma, as técnicas de diagnóstico devam basear-se preferencialmente na mediação das respostas dos linfócitos T, uma parcela da população tende, por razões provavelmente genéticas, a responder através de estímulos dos linfócitos B e, conseqüentemente, da produção de altos títulos de anticorpos. Os animais que apresentam uma fraca resposta celular, denominados não reativos ou anérgicos ao teste intradérmico, de uma forma geral apresentam uma evolução mais rápida e grave da enfermidade, já que a produção de anticorpos normalmente não é suficiente para impedir o desenvolvimento e multiplicação do bacilo. Além destes, também os animais que, na fase inicial da infecção respondiam favoravelmente aos testes celulares tendem a se tornar anticorpos responsivos, na medida que a doença progride devido a uma maior carga antigênica representada pela multiplicação bacteriana em seu organismo. Uma vez que a infecção nestes animais nem sempre pode ser detectada pelos testes celulares acima citados, faz-se necessário um sistema complementar de diagnóstico que seja capaz de identificá-los. É importante ressaltar que, devido

a forma progressiva da doença, os animais tendem a ser altamente bacilíferos e a eliminar formas viáveis de *M. bovis* pelas vias respiratórias, infectando assim todo o rebanho (LILENBAUM, 1999).

Dessa forma, o teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para os antígenos micobacterianos imaturos apresenta valor limitado, mas um teste de ELISA que pesquise anticorpos, para definir o antígeno do *M. bovis* antes e após o teste cutâneo, parece ser útil para detectar os reagentes não específicos (RADOSTITS et al., 2002). Nesse caso, seriam necessários ao menos dois testes, um baseado na avaliação da resposta celular, como o teste de tuberculinização e outro, capaz de identificar os animais anérgicos, que respondem à infecção através da produção de anticorpos. Estes tendem a ser complementares entre si e, em uma população, sua aplicação conjunta tende a identificar cerca de 100% dos animais infectados, permitindo dessa forma um controle mais rápido e eficiente da enfermidade (LILENBAUM, 1999).

De acordo com Almeida et al.,(2006), vários testes *in vivo* e *in vitro* tem sido desenvolvidos para o diagnóstico da infecção por *M. bovis*, tais como a hipersensibilidade com ESAT-6, linhagens de macrófagos, aglutinação em látex, testes de imunoabsorção enzimática - ELISA e a reação da polimerase em cadeia - PCR. Entretanto, o que vem sendo mais avaliado é a detecção de IFN-gama bovino. O ensaio é realizado *in vitro* e é baseado na detecção de IFN-gama liberado por linfócitos sensibilizados durante incubação com material antigênico que contém antígenos espécie-específicos. Os animais infectados com *M. bovis* têm linfócitos Th1 sensibilizados aos antígenos da micobactéria e liberam IFN-gama que será detectado no plasma por ELISA de captura com anticorpo monoclonal (WALRAVENS et al. 2002, WATERS et al. 2003). No teste de Elisa por captura ou Elisa sanduíche os linfócitos T, na presença de células apresentadoras de antígenos são capazes de secretar gama-interferon, que pode ser titulado através desse teste que possui alta sensibilidade quando comparado aos testes de tuberculinização (95,2 versus 65,6%). Problemas de reações falso-positivas decorrentes de reações cruzadas podem ser minimizados pelo uso de ensaios comparativos, dos quais os títulos de gama-interferon da amostra de PPD bovino são comparados aos títulos de uma resposta ao PPD aviário (SOUZA et al, 1999).

A técnica visa a avaliação de respostas celulares “*in vitro*”, 3 dias depois de realizada a prova de tuberculinização simples. Amostras de sangue heparinizadas são coletadas e incubadas por 24 horas com PPD bovino, utilizado como antígeno para que ocorra a estimulação antigênica

de linfócitos T circulantes presentes na amostra. A detecção de interferon gama após estimulação do sangue total com PPD mostrou-se muito útil e específico para detectar animais tuberculosos, e vem sendo empregado como teste complementar da tuberculinização em alguns países, como Austrália e Nova Zelândia (SOUZA et al, 1999).

Os métodos diretos passaram por uma verdadeira revolução em virtude do desenvolvimento do método molecular denominado reação da polimerase em cadeia (PCR), que tem como princípio básico a detecção de um fragmento de DNA específico do gênero ou então do complexo *M. tuberculosis*. Métodos de biologia molecular estão sendo desenvolvidos para detectar diretamente o agente em amostras clínicas, para identificar o agente isolado pelos métodos clássicos de bacteriologia e para avaliar a variação genética dentro de uma espécie de micobactéria. As técnicas moleculares já encontram alguma aplicação prática dentro dos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, sendo utilizadas de forma complementar aos procedimentos bacteriológicos clássicos (SAKAMOTO, 1997).

A resposta de anticorpos contra proteína purificada derivada do *M. bovis* (PPD) foi avaliada por ELISA em diferentes rebanhos com tuberculose. Em gado livre de tuberculose, os valores de densidade óptica foram significativamente mais baixos do que aqueles obtidos nos rebanhos controlados infectadas com tuberculose bovina confirmada. Níveis mais altos de anticorpos foram encontrados em amostras de soro de bovinos tuberculosos em rebanhos infectados. No entanto, alguns animais do grupo controle, sem indivíduos tuberculina reatores por cerca de um ano, apresentaram altos valores no ELISA, sugerindo a presença de uma infecção residual nestes rebanhos. Dois dos mais altos títulos de anticorpos foram encontrados em dois animais com tuberculose, nenhuma reação à tuberculina, confirmando a utilidade do ELISA com PPD como antígeno para identificar os animais anérgicos. Os anticorpos anti - PPD poderiam ajudar a verificar a situação epidemiológica da TB nos rebanhos sob controle na campanha de erradicação (ESTRADA-CHÁVEZ et al.;2001).

5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Atualmente, a infecção apresenta consequências significantes na pecuária local, nacional e mundial (NEILL, 1994). A importância econômica atribuída à doença bovina está baseada nas perdas diretas e indiretas resultantes da morte de animais, da queda no ganho de peso,

da diminuição da produção de leite, do descarte precoce de animais, da eliminação de animais de alto valor zootécnico e da condenação de carcaças no abate. Estima-se que os animais infectados percam de 10% a 25% de sua eficiência produtiva. Existe ainda a perda de prestígio e credibilidade da unidade de criação onde a doença é constatada (BRASIL, 2006).

No Brasil, estima-se a existência de 200 mil bovinos infectados entre uma população total de aproximadamente 170 milhões (LEITE, 2003). 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).

A tuberculose bovina é importante não apenas por causar prejuízos econômicos, mas também pelo fato de ser uma fonte de infecção para seres humanos (ACHA; SZYFRES, 2003).

6 IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA

Como zoonose, suspeita-se que a infecção pelo patógeno seja responsável, no Brasil, por aproximadamente 100 mil casos anuais de tuberculose humana (LEITE, 2003). Os seres humanos parecem ser tão susceptíveis a *M. bovis* quanto a *M. tuberculosis* (HUCHZERMEYER, 1994). Atualmente, o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e outros tipos de imunossupressão ocasionados por fatores como quimioterapia ou transplante de órgãos (MATTOS, 2006) são associados ao aumento no risco de doenças em indivíduos infectados por *M. tuberculosis*. Acredita-se que esse aumento ocorra também no caso das infecções por *M. bovis* em seres humanos (O'REILLY; DABORN, 1995).

Sendo considerada em sua essência uma “epidemia lenta”, a tuberculose, apesar da evolução do conhecimento na área de saúde pública e dos novos métodos de diagnóstico disponíveis, ressurgiu nos dias de hoje como uma “emergência global” (PAULA, 1988). Por ser responsável pelo maior índice de mortalidade humana causada por um único agente infeccioso, em 1993 ela foi declarada pela Organização Mundial de Saúde como questão de urgência à saúde pública global, representando 26% das mortes previsíveis e 7% de todas as mortes na terra. A estimativa para os anos de 2000 a 2020 é de que aproximadamente um bilhão de pessoas estarão infectadas por *Mycobacterium* e destas, caso o controle não seja eficiente e rígido, 200 milhões adoecerão e 35 milhões irão a óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

7 CONTROLE

A tuberculose bovina pode ser controlada em um país ou uma região através da implantação de uma política de teste e sacrifício, se não existirem outros hospedeiros reservatórios para manter a infecção no local. 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). Embora normalmente não considerada relevante para programas de eliminação nos animais de produção, a vacinação de animais contra tuberculose seria uma estratégia viável em animais domésticos e em animais silvestres que podem ser reservatórios da doença em países endêmicos (COSIVI, 1998). Além disso, recentes avanços na tecnologia das vacinas contra tuberculose podem tornar a medida viável para produções de bovinos em um futuro próximo (VORDERMEIER, 2006).

Como medida de controle da transmissão de *M. bovis* para seres humanos, a inspeção sanitária dos produtos de origem animal destinados ao consumo humano e a pasteurização ou esterilização do leite e derivados diminuem os riscos de transmissão de *M. bovis* ao homem (HUGH-JONES, 1995). Além disso, é importante que a saúde dos trabalhadores das propriedades rurais seja rotineiramente monitorada.

Ações de restrição de contato com possíveis reservatórios domésticos, sinantrópicos ou silvestres também devem ser consideradas (BRASIL, 2006). Embora em países desenvolvidos a pasteurização e programas de erradicação de rebanhos positivos para tuberculização tenham reduzido a incidência de doenças humanas e bovinas causadas pelo *Mycobacterium bovis*, o controle da tuberculose bovina e programas de erradicação foram implantados apenas recentemente no Brasil. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose Humana foi implantado em 1996 no Brasil e tem por objetivo realizar o tratamento supervisionado dos pacientes, para diminuir a taxa de abandono, evitar o surgimento de bacilos resistentes e possibilitar um efetivo controle da tuberculose humana no país (BRASIL, 2002).

Do mesmo modo, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído apenas em 2001 pelo Ministério da Agricultura,

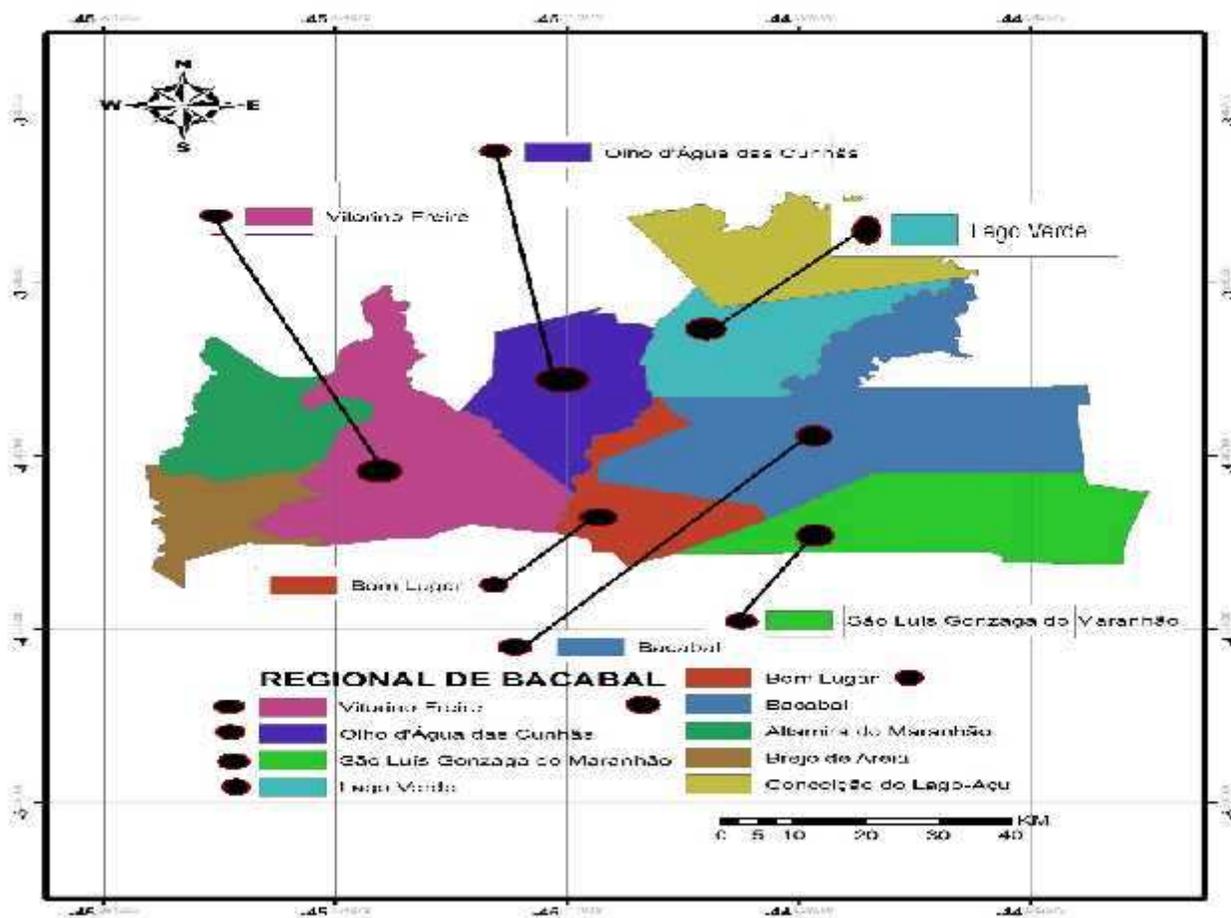
Pecuária e Abastecimento, com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde comunitária, pela redução da prevalência e da incidência de novos casos. O PNCEBT definiu uma estratégia de diagnóstico para essas doenças e a certificação de propriedades livres, onde essas enfermidades serão controladas com grande rigor (BRASIL, 2006). O programa visa à redução da tuberculose bovina através da estratégia de identificação das fontes de infecção e abate dos animais reagentes, teste dos animais na origem antes da introdução no rebanho, controle de trânsito animal, certificação de propriedades livres de tuberculose, inspeção de carcaças e controle dos rebanhos testados em todo o território nacional. Além disso, o projeto visa promover também a competitividade da pecuária nacional, criando um número significativo de propriedades certificadas que oferecem ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2006).

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Área de estudo e população

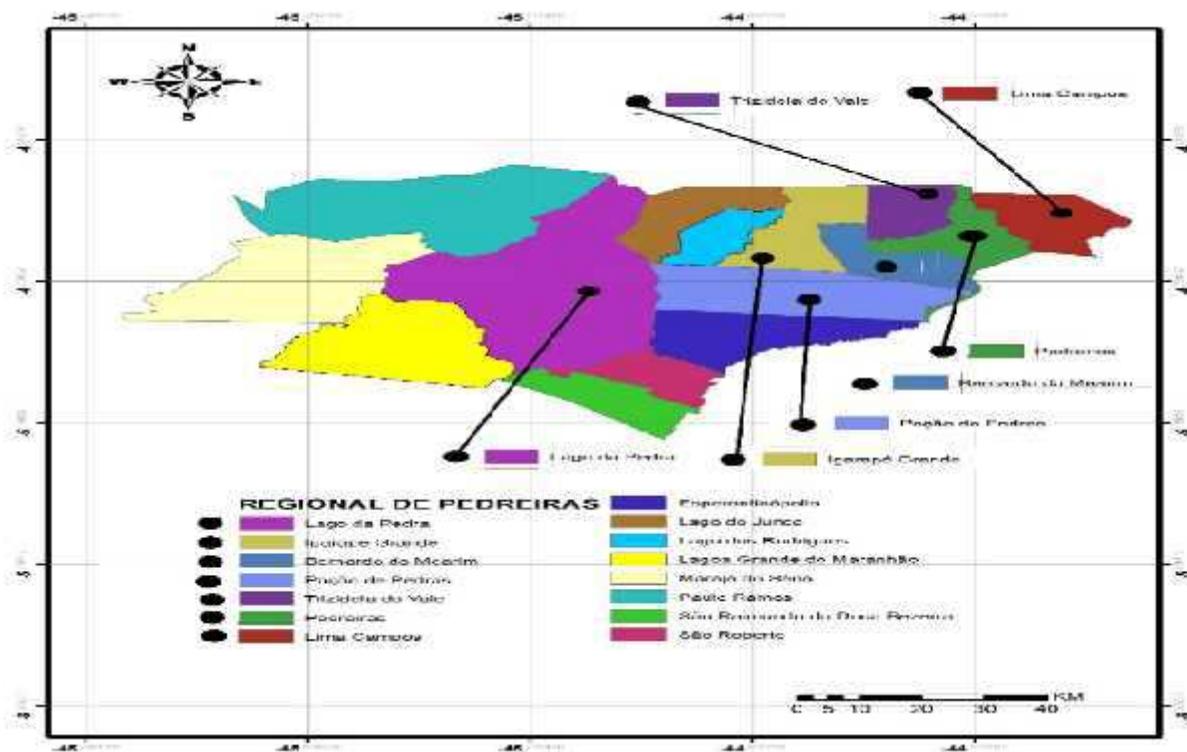
A área de estudo compreendeu as bacias leiteiras das regionais de São Luís, Bacabal e Pedreiras. Foram consideradas como principais aglomerações as áreas onde a pecuária está predominantemente destinada à produção de leite, de acordo com os dados cadastrais da AGED (2012). Foram selecionados os municípios com a produção de leite ≥ 1.000 litros, distribuídos por regionais: *São Luís* (São Luís); *Bacabal* (Bacabal, Bom Lugar, Lago Verde, Olho d'Água das Cunhãs, São Luís Gonzaga e Vitorino Freire) e *Pedreiras* (Bernardo do Mearim, Igarapé Grande, Pedreiras, Trizidela do Vale, Lima Campos, Poção de Pedra e Lago da Pedra), conforme Figuras 1, 2 e 3.

Figura 1. Mapa dos municípios que compõem a regional Bacabal-MA.



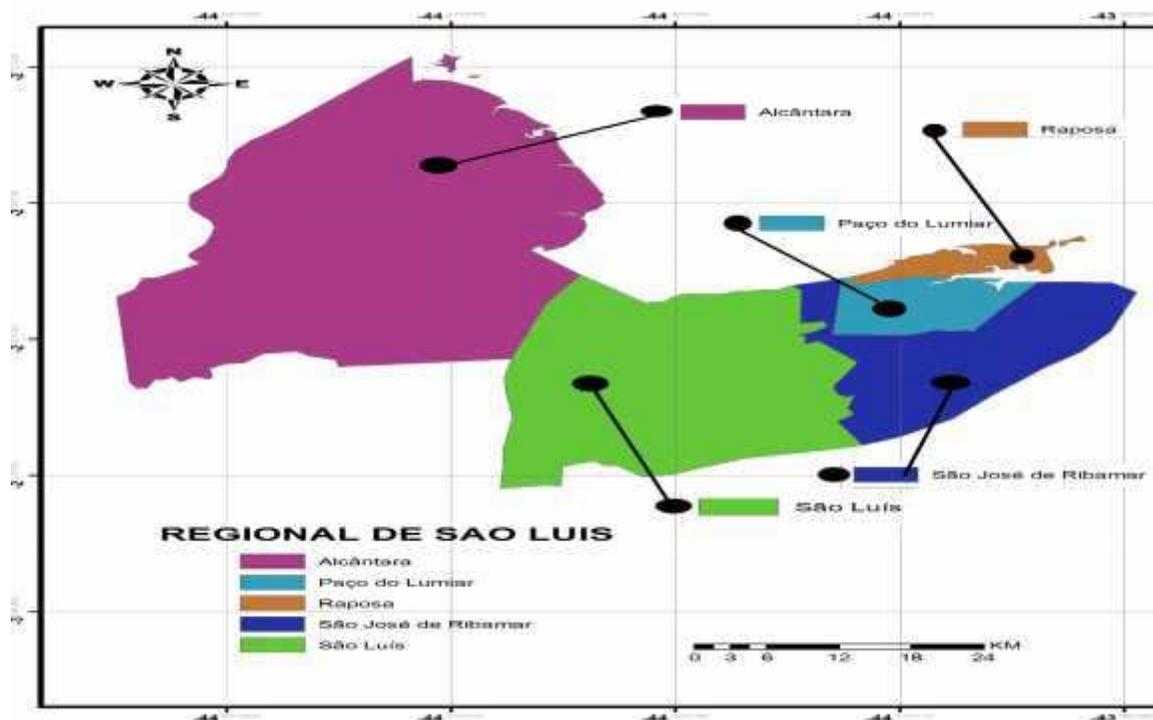
Fonte: IBGE 2014

Figura 2. Mapa dos municípios que compõem a regional de Pedreiras -MA.



Fonte: IBGE 2014

Figura 3. Mapa dos municípios que compõem a regional de São Luís – MA.



Fonte: IBGE 2014

8.2 Amostragem

A amostragem foi conduzida conforme preconizado pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES (1979) para estudo de estimativa de prevalência. Para se definir o número de amostras foi utilizada a seguinte expressão:

n = número de amostras

p= prevalência esperada

z= grau de confiança

d= margem de erro

Foi adotada como valor de referência para estabelecer o tamanho da amostra a expressão de soros positivos encontrados por Santos (1988) na Ilha de São Luís, MA que foi de 27,1 %, considerando-se um erro (d) não superior a 15%, um grau de confiança de 95% (z).

p= 27,1% z= 1,96 (95%) d= 15% de erro, onde:

$$n = \frac{27,1 (100 - 27,1) 1,96^2}{\left(\frac{27,1 \times 15}{100} \right)^2} = 420,57 \text{ amostras}$$

Foi feito um ajuste para 420 amostras, possibilitando dessa forma a coleta de seis animais por propriedade.

8.3 Seleção dos animais

Foram selecionadas fêmeas com idade \geq a 24 meses de idade, distribuídas nos municípios das regionais de São Luís, Bacabal e Pedreiras, sendo escolhidas de forma aleatória simples 420 amostras distribuídas em 70 propriedades de 14 municípios. Dessa forma foram coletados 06 amostras por propriedade (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição amostral de rebanhos de acordo com a regional e municípios para detecção de anticorpos contra o *M. bovis*, 2014.

MUNICÍPIO/UR	Total de Coletas		
(UR)PEDREIRAS	PROPRIEDADES	F>24M/Prop.	210
BERNARDO DO MEARIM	5	6	30
IGARAPÉ GRANDE (EAC)	5	6	30
LAGO DA PEDRA (UVL)	5	6	30
LIMA CAMPOS	5	6	30
PEDREIRAS (UVL)	5	6	30
POÇÃO DE PEDRAS (UVL)	5	6	30
TRIZIDELA DO VALE	5	6	30
(UR)PEDREIRAS	35	42	180
BACABAL (UVL)	5	6	30
BOM LUGAR (EAC)	5	6	30
LAGO VERDE (EAC)	5	6	30
OLHO D'ÁGUA DAS CUNHAS	5	6	30
SÃO LUÍS GONZAGA DO	5	6	30
VITORINO FREIRE	5	6	30
(UR)BACABAL	30	36	180
ÍLHA DE SÃO LUÍS	5	6	30
TOTAL	135		420

8.4 Técnicas de Diagnóstico

8.4.1 Coleta de amostras

Amostras de sangue foram coletadas através da punção da veia jugular, utilizando-se tubos a vácuo de 10 ml, com gel separador, devidamente esterilizados e identificados. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente para formação e retração do coágulo. Sendo conduzidas, sob refrigeração, para o Laboratório de Doenças Infecciosas do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, onde foram centrifugadas durante 5 minutos com força real de centrifugação igual a 1.000G. As alíquotas de soro obtidas foram transferidas para tubos de Ependorfs, previamente identificados e mantidos em temperatura de congelamento (-20°C) até a realização do teste ELISA Indireto, segundo protocolo previamente padronizado e desenvolvido por (IDEXX *M. BOVIS* AB TEST, 2014).

8.4.2 Princípio do teste ELISA.

O kit *M. bovis* IDEXX é um ensaio imunoenzimático formulado para detectar anticorpos contra *M. bovis* em amostras de soro e plasma bovino. A microtitulação pode ser realizada impregnando-se placas de 96 cavidades com antígenos de *M. bovis* recombinantes. Durante a incubação da amostra de teste na cavidade impregnada com antígenos, anticorpos específicos contra *M. bovis*, se presentes, formam complexos com os antígenos impregnados. Em seguida, as cavidades são lavadas para retirar o material não aderido e é acrescentado um conjugado de anticorpo antibovino: peroxidase de raiz forte (HRPO), que se liga ao anticorpo bovino aderido às cavidades. Na etapa seguinte, o conjugado que não se ligou ao antígeno é lavado e o substrato de tetrametilbenzidina (TMB) é acrescentado. O surgimento de cor varia de acordo com a quantidade de anticorpos anti-*M. bovis* ligados ao antígeno.

8.4.3 Preparo dos reagentes

8.4.3.1 Solução de lavagem

O Concentrado de Lavagem (10X) pode se precipitar ao ser armazenado entre 2–8°C, por isso foi dissolvido completamente antes de usar. Para preparar a solução de trabalho (1X), colocou-se 50 mL do Concentrado de Lavagem (10X) em uma proveta graduada, adicionou-se 450 mL de água destilada/deionizada e homogeneizou-se bem. A solução diluída foi armazenada entre 18–26°C e utilizada em seguida, podendo estar viável por até 3 dias nessas condições ou entre 2–8°C por até 2 semanas.

8.4.3.2 Amostras e controles

As amostras e controles do kit foram diluídas na proporção 1:50 (uma parte de amostra para 49 de diluente). Os controles do kit foram testados em duplicata para cada série de testes.

8.4.3.3 Procedimento de Teste

Todos os reagentes devem estar entre 18–26°C antes do uso. Os reagentes foram homogeneizados por meio de movimentos suaves e mantidos entre 18–26°C durante pelo menos 2 horas antes do início do teste cuja sequência foi:

1. As placas impregnadas com antígeno foram retiradas da bolsa e anotadas a posição das amostras. Quando as placas eram usadas parcialmente, retiravam-se apenas cavidades

suficientes para testar as amostras. As outras cavidades e o dessecante eram colocados na bolsa ziplock e guardados novamente entre 2–8°C.

2. Colocou-se 100 μ l de controle negativo diluído em Azida Sódica, em duplicata.

3. Colocou-se 100 μ l de controle positivo diluído, em duplicata.

4. Colocou-se 100 μ l de amostra diluída nas cavidades apropriadas. As amostras podem ser testadas em duplicata, mas uma única cavidade por amostra foi testada.

5. As placas foram cobertas e incubadas em temperatura ambiente em torno de 18–26°C por 60 minutos (\pm 5 minutos).

6. O líquido das cavidades de micro titulação foi aspirado e lavado por cerca de 300 μ l de Solução de Lavagem em cada cavidade; em seguida, a solução foi retirada. Repetiu-se a lavagem 3 vezes. Tomou-se cuidado para que a placa não secasse entre as lavagens e entre cada etapa do teste.

7. Foram colocados 100 μ l de Conjugado em cada cavidade.

8. As placas foram cobertas e novamente incubadas entre 18–26°C por 30 minutos (\pm 2 minutos).

9. O líquido foi aspirado das cavidades e lavado 3 por vezes, conforme descrito na etapa 6.

10. Colocou-se 100 μ l de Substrato tetra metil benzidina (TMB) em cada cavidade.

Para evitar a contaminação do frasco do Substrato de TMB foi retirada a quantidade apropriada de TMB do frasco em um recipiente separado, e pipetado a partir deste recipiente e os restos de TMB foram descartados em vez de recolocá-los no frasco original.

11. As placas foram cobertas e incubadas entre 18–26°C por 15 minutos (\pm 1 minuto).

12. Colocou-se 100 μ l de Solução de Interrupção em cada cavidade.

13. A leitora foi zerada com água ou ar realizada a absorvância a 450 nm usando uma leitora de microplacas.

14. Os resultados foram calculados através da seguinte fórmula

Fórmula para cálculo dos resultados das amostras:

A densidade óptica média deve ser igual ou maior que 0,300 para os Controles Positivos (CPx) e igual ou menor a 0,200 para os Controles Negativos (CNx) Para resultados inválidos deve-se repetir o teste após revisão cuidadosa das instruções de uso. A presença ou não de anticorpos contra *M. bovis* é determinada calculando-se a razão amostra/Positivo (A/P) para cada amostra, conforme exemplo abaixo

Média dos controle Negativos (CNx)	$\frac{(CNx) = CN1 A(450) + CN2 (450)}{2}$	Média da Amostra - 0,850
Relação AP Interpretação dos Resultados	$\frac{AP = AMOSTRA A(450) - CNx}{CNx - CPx}$	$0,850 - 0,080 = 0,77 = 1,19$ $0,73 - 0,080 = 0,65$

Fonte: Manual IDEXX 2014

15: As amostras com relações A/P iguais ou maiores que 0,30 foram consideradas positivas para anticorpos contra *M. bovis*. As amostras com relações A/P inferiores a 0,30 foram consideradas negativos para anticorpos *M. bovis*.

09- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de animais, rebanhos regentes ao *Mycobacterium bovis* e municípios onde a doença prevalece está demonstrado na Tabela 2

Tabela 2-Distribuição de animais regentes ao teste Elisa Indireto para detecção de *Mycobacterium bovis* em rebanhos leiteiros do Maranhão, 2014.

	Reagentes		Reagentes		TOTAL
	N	%	N	%	
Animais	401	95,48	19	4,52	420
Rebanhos	60	85,71	10	14,29	70
Municípios	4	28,57	10	71,43	14

O teste Elisa é adequado para a detecção de anticorpos de *M. bovis* em amostras de soro e plasma bovino. O teste também é útil ao realizar exames sorológicos para compreender a prevalência e o risco de infecção por *M. bovis* e se caracteriza por sua boa especificidade (97,5% - 98,4%) e sensibilidade (64,6%). Vale ressaltar que, um resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção por *M. bovis*. Os anticorpos contra *M. bovis* podem apresentar níveis flutuantes, podem surgir posteriormente na evolução da infecção, ou alguns animais infectados podem não desenvolver soro conversão. Já um resultado positivo sugere que o animal testado possui anticorpos contra *M. bovis*. Devido à possibilidade de exposição e resposta à micobactérias no ambiente (p.ex. *M. kansasii*), todos os resultados positivos de testes para tuberculose (cutâneos,

interferon gama e ELISA) e as histórias do rebanho devem ser levadas em conta ao determinar a classificação dos animais ou rebanhos

O kit é muito específico com relação às micobactérias ambientais (p. ex. *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*). Os isolamentos de *M. kansasii* são raros, mas a infecção com (altas doses) de *M. kansasii* pode resultar em resultados falso positivos, impondo limitações que comprometem testes de investigação baseados em proteínas conservadas dentre as espécies de micobactérias. (IDEXX LABORATORIES, 2014).

Farias et al.,(2012) utilizando o teste imunoenzimático (ELISA) contendo proteínas recombinantes MPB70 e p27 de *M. bovis* detectaram anticorpos contra esta bactéria em bovinos, constatado sensibilidade e especificidade de 88,7% e 94,6%, respectivamente, para o ELISA-MPB70 e de 98,1% e 91,9% para o ELISA-p27. Segundo os autores, o uso de testes sorológicos, como ELISA recombinante, juntamente com testes celulares, pode resolver problemas relacionados ao diagnóstico da tuberculose bovina como resultados inconclusivos e ausência de animais anérgicos em estágios avançados da infecção.

Segundo Radostits et al.(2002), o uso do teste imunoenzimático ELISA para os antígenos micobacterianos imaturos apresenta valor limitado, mas um teste de ELISA que pesquise anticorpos para definir o antígeno de *M. bovis* antes e após o teste cutâneo é útil para detectar reagentes não específicos .

Lilenbaum et al.,(2001) usaram experimentalmente ELISA para o diagnóstico de tuberculose bovina sendo verificado valores de 86,7% para sensibilidade e 90,6% para a especificidade do teste. O estudo também identificou 13 (5,9%) animais de um total de 220 não reativos aos testes intradérmicos de tuberculinização e, entretanto reativos ao teste de ELISA. Os animais se mostraram em uma etapa posterior como infectados, assim, os autores alertam que, sem a utilização do ELISA, estes animais seriam considerados como não infectados e permaneceriam no rebanho, atrasando ou mesmo comprometendo o sucesso do programa de controle da doença.

Estudos sobre a resposta imune da tuberculose sugerem uma troca de dominância de células T *helper* tipo 1 (Th1) por resposta imune Th2, associado com a supressão da imunidade mediada por células (CMI) e aumento da resposta humoral, a medida que a doença progride(RITACCO et al., 1991).

Com o objetivo de identificar o mais precocemente a tuberculose bovina, Waters et al., (2006) diagnosticaram a doença em quatro semanas, quantificando anticorpos (IgM) específicos para *M. bovis* em bovinos experimentalmente infectados .

Segundo Lyashchenko et al.(2004), quanto maior a severidade da doença, maior o título de anticorpos nos animais. Já Pollock et al., (2005) citam que os países em desenvolvimento podem adotar os testes sorológicos nos programas de erradicação da tuberculose como uma alternativa barata para detecção e remoção de animais em estados avançados da doença de seus rebanhos

Na tabela III observam-se os resultados por cada uma das três regionais estudadas, onde foram encontradas frequências de 2,38, 5,00% e 16,67% para as regionais de Pedreiras, Bacabal e São Luís, respectivamente.

Tabela 3. Distribuição de animais reagentes e não reagentes ao teste ELISA Indireto para detecção de *Mycobacterium bovis* em rebanhos leiteiros por Regionais do Maranhão, 2014

	NEGATIVO		POSITIVOS		
	N	%	N	%	
(UR)PEDREIRAS	205	97,62	5	2,38	210
(UR)BACABAL	171	95,00	9	5,00	180
UR SÃO LUÍS	25	83,33	5	16,67	30
Total/Média	401	95,48	19	4,52	420

Segundo a OIE (2014) o diagnóstico de tuberculose bovina com o teste imunoenzimático (ELISA) utilizando o derivado de proteína purificada (PPD) como antígeno, para detectar de forma rápida a infecção clínica e subclínica, evidenciou 37 animais positivos, o que representa uma sensibilidade de $69,81 \pm 12,36\%$ e valor preditivo positivo do teste de $0,97 \ 56,06 \pm 11\%$; detectou 74 soros negativos, o que representa uma especificidade de $71,84 \pm 8,69\%$ e valor preditivo negativo de $82,22 \pm 7,90\%$

Brasil (2006) cita que a média nacional de tuberculose referente ao período 1989 a 1998 foi de 1,3% de animais reagentes à tuberculina, o que está abaixo da frequência encontrada no rebanho estudado nas regionais de Bacabal, Pedreiras e São Luís que foi de 4,52 %, enquanto que Santos (1988) em trabalho realizado na Ilha de São Luís, MA encontrou 27,1 % de prevalência, considerando-se um erro (d) não superior a 15%, um grau de confiança de 95% (z).

A prevalência de tuberculose no estado do Maranhão, também foi estudada por Duarte e Alves (1994) onde tuberculinizaram 500 bovinos pelo método cervical comparativo e diagnosticaram 45 (9%) de reagentes positivos e 20 (4%) suspeito, o que não difere muito dos resultados encontrados cuja frequência média foi 4,52%, nas três regionais estudadas.

Fráguas et al.(2008) pesquisando tuberculose, por métodos diretos e indiretos em 97 bovinos encaminhados ao abate sanitário e matadouros localizados no estado do Rio de Janeiro identificaram, mediante o teste ELISA 33(34,02%) animais positivos, com 36 (37,11%) amostras com resultados concordantes aos do exame histopatológico e baciloscopia .

Sabe-se que a aplicação intradérmica de PPD de origem bovina determina uma reação imune de tal magnitude que causa uma redução da habilidade reativa do animal, fenômeno amplamente conhecido como dessensibilização, portanto, em período inferior a 60 dias desde a última aplicação intradérmica de PPD bovino pode haver baixo título de anticorpos no soro dos animais diminuindo assim a sensibilidade do teste ELISA (MONHAGHAN et al., 1994).

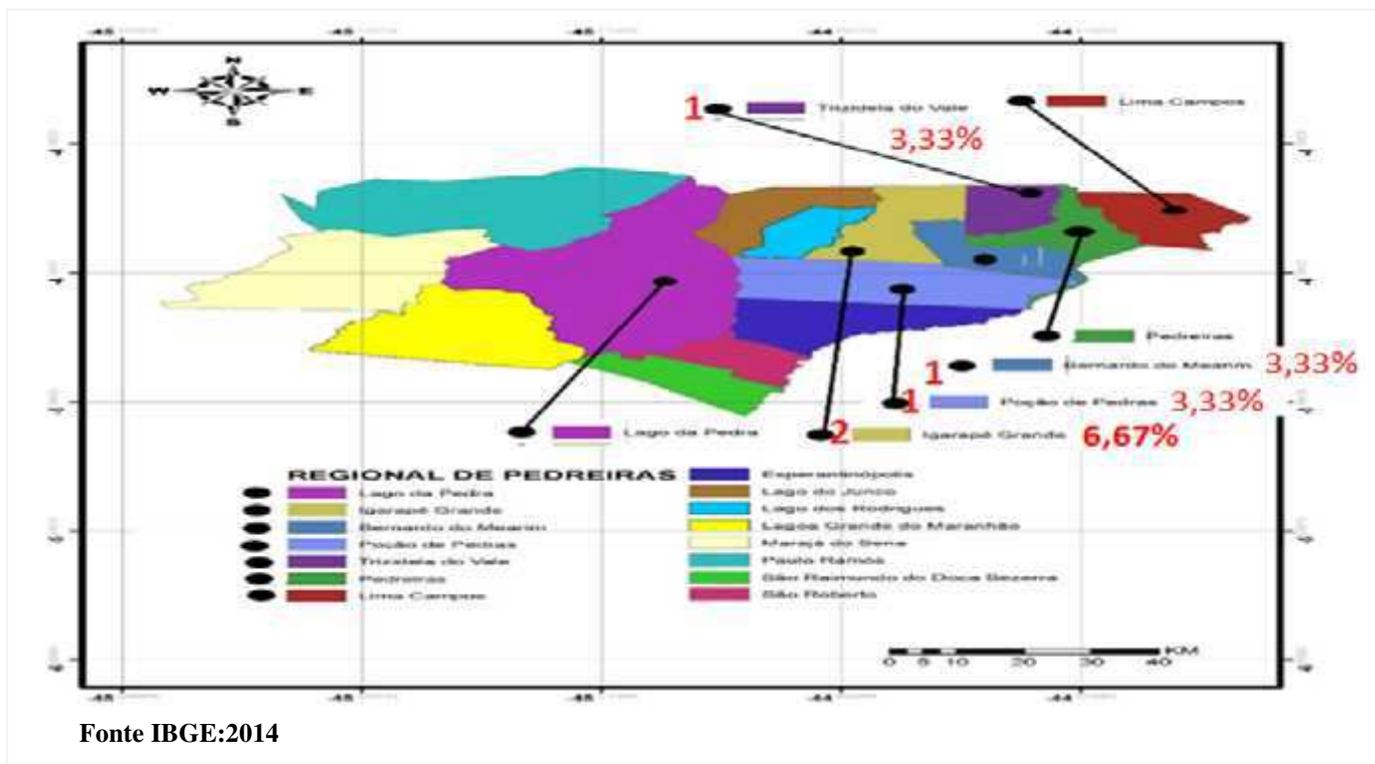
Na Tabela 4 observa-se a distribuição de animais reagentes por municípios nas três regionais estudadas.

Tabela 4. Distribuição dos animais reagentes e não reagentes por Municípios da Regional de Pedreiras

MUNICÍPIO/UR	Não Reag.		Reag.		TOTAL
	N	%	N	%	
BERNARDO DO MEARIM	29	96,67	1	3,33	30
IGARAPÉ GRANDE	28	93,33	2	6,67	30
LAGO DA PEDRA (UVL)	30	100,00	0	0,00	30
LIMA CAMPOS	30	100,00	0	0,00	30
PEDREIRAS (UVL)	30	100,00	0	0,00	30
POÇÃO DE PEDRAS	29	96,67	1	3,33	30
TRIZIDELA DO VALE	29	96,67	1	3,33	30
	205	97,62	5	2,38	210
BACABAL	29	96,67	1	3,33	30
BOM LUGAR	29	96,67	1	3,33	30
LAGO VERDE	29	96,67	1	3,33	30
OLHO D'ÁGUA DAS CUNHAS	26	86,67	4	13,33	30
SÃO LUÍS GONZAGA DO MARANHÃO	30	100,00	0	0,00	30
VITORINO FREIRE	28	93,33	2	6,67	30
	171	95,00	9	5,00	180
São Luís	25	83,33	5	16,67	30
TOTAL	401	95,48	19	4,52	420

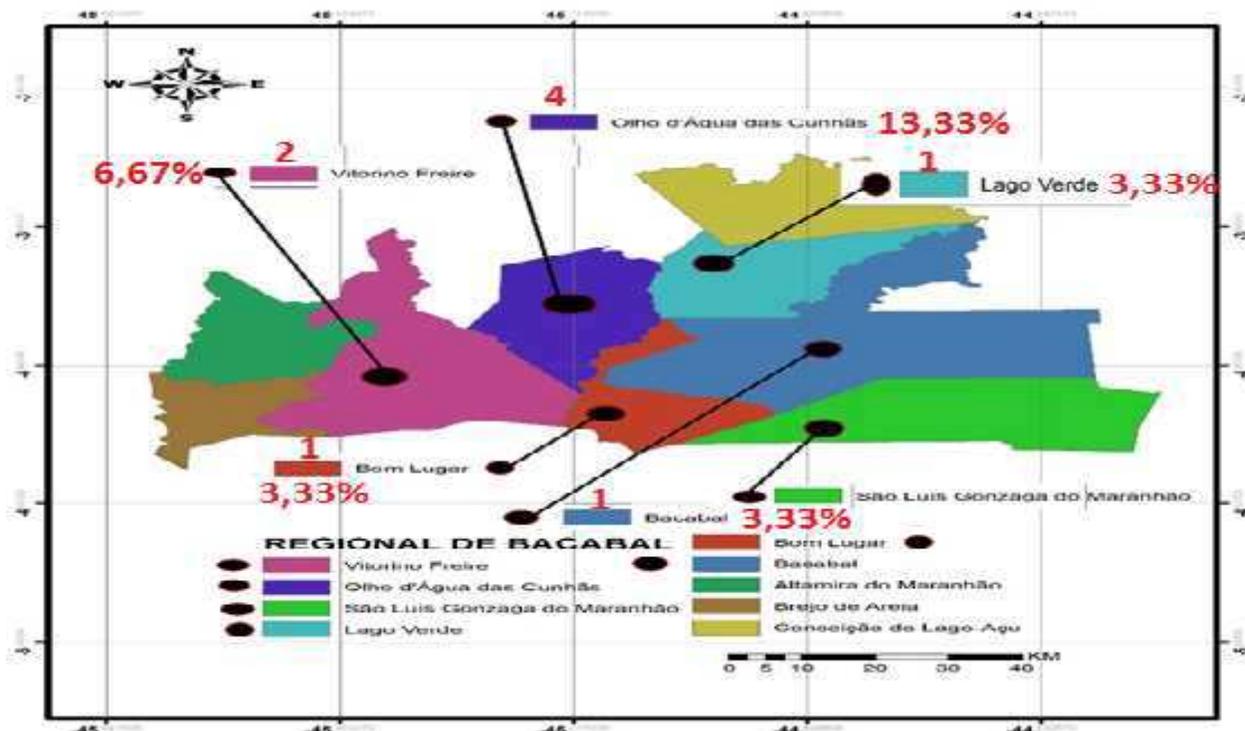
O georreferenciamento dos 15 municípios da regional de Pedreira demonstrou áreas de foco da doença em quatro municípios dos seis amostrados (Figura 4). Os municípios que apresentaram animais reagentes para o *M. bovis* foram: Trizidela do Vale (3,33%), Bernardo do Mearim (3,33%), Poção de Pedras (3,33%) e Igarapé Grande (6,67%), o que demonstra que o *M. bovis* está presente em 26,67% dos municípios dessa Regional, enquanto que o *M. bovis* está presente em 66,67% dos municípios coletados conforme Figura 4.

Figura 4. Mapa dos municípios com animais reagentes na Regional de Pedreiras



O georreferenciamento da regional de Bacabal (Figura 5) demonstrou que dos 9 municípios existentes, seis tiveram amostras coletadas, dos quais, cinco apresentaram animais reagentes, Vitorino Freire, Olho D'água das Cunhãs, Lago Verde, Bom Lugar e Bacabal, com frequências de anticorpos para o *M. bovis* de 6,67%, 13,33%, 3,33%, 3,33% e 3,33 % respectivamente, o que demonstra que o *M. bovis* está presente em 57,14 % dos municípios dessa Regional.

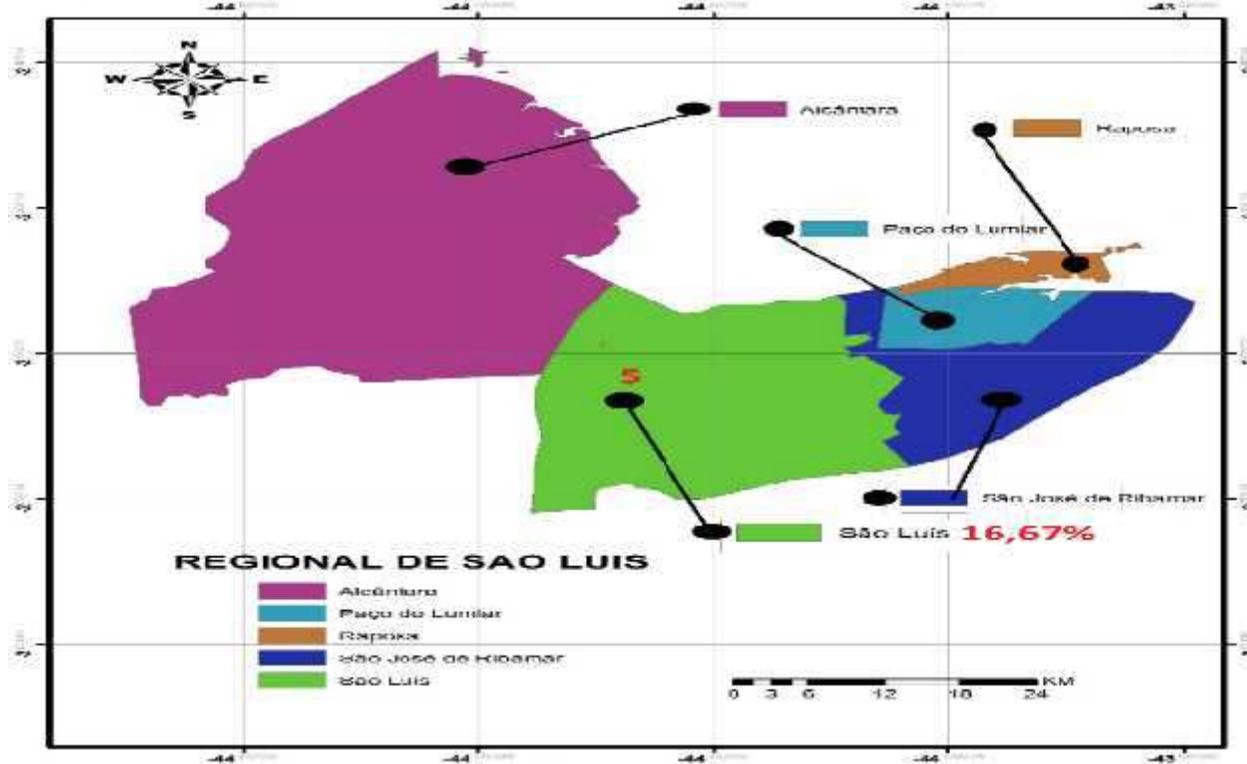
Figura 5. Mapa dos municípios com animais reagentes na Regional de Bacabal-MA.



Fonte: IBGE 2014

No georreferenciamento da regional de São Luís foi detectada a presença do *M. bovis* em 16,67% 5 dos rebanhos avaliados(5/30), conforme Figura 6.

Figura 6. Mapa dos municípios com animais reagentes na Regional de São Luís -MA.



Fonte: IBGE 2014

10- CONCLUSÃO

Os testes para detecção de anticorpos podem e devem ser adotados em programas de controle e erradicação da tuberculose como uma alternativa de diagnóstico da tuberculose bovina;

O georreferenciamento dos municípios amostrados identificou áreas com frequência elevada de tuberculose.

O teste de ELISA demonstrou ser útil para o diagnóstico de infecções por *M. bovis* e uma alternativa para o diagnóstico em animais em estados avançados da doença, quando usado em animais negativos às provas de tuberculizações podem identificar animais anérgicos e possíveis reservatórios da tuberculose.

11-REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. Bacterioses and Mycoses. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, 2003. p. 107-297.

ADWELL, F. E.; KEEN, D. L.; PARLANE, N. A.; SKINNER, M. A.; DE LESLE, G. W.; BUDDLE, B. M. Oral vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in brushtail possums. **Vaccine**, Guildford, v. 22, n. 1, p. 70-76, 2003.

AGED/MA: **Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão**. Disponível em: <<http://www.aged.ma.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO MARANHÃO – AGED. **Arquivo impresso**. Consulta em: 20 mai 2014.

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, 2004.

BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. Roca. São Paulo. 1988, 380p.

BELCHIOR, A.P.C. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. 2000**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

BRASIL. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal** - PNCEBT. MAPA/SDA/DSA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002.

BRASIL. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal** - PNCEBT. MAPA/SDA/DSA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

BROSCH, R. 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.

CAFFREY, J. P. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 1-4, 1994.

CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988. p.186-191.

CASSIDY, J. P. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 151-161, 2006.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.843.

COSIVI, O.; GRANGE, J.M.; DABORN, C.J.; RAVIGLIONE, M.C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R.A.; HUCHZERMAYER, H.F.A.K.; KANTOR, I.; MESLIN, F.X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 59-70, 1998.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A.. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the

Mycobacterium tuberculosis complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.53, p.1306-1314, 2003.

DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; KAZWALA, R. R. The bovine tuberculosis cycle-an African perspective. **Journal of Applied Microbiology**. v. 81, p. 27s-32s, 1996.

DORMANDY, T. **The white death: a history of tuberculosis**. 3 ed. London: Hambledon & London, 2002. 448 p.

DUNLOP, R.H.& WILLIAMS, D.J. **Veterinary Medicine: An Illustrated History**. Saint Louis: Mosby, 1996. 692 p.

ESSEY, M. A.; KOLLER, M. A. Status of bovine tuberculosis in North America. **Veterinary Microbiology**. v.40, n.1/2, p.15-20, 1994.

ETCHECHOURY, G.; ECHEVERRIA, V.; MORCILOZ, N.; SEQUEIRA, M. D.; IMPERIALEZ, B.; LOPEZ, M.; CAIMI, H.; ZOMARRAGA, M. J.; CATALDI, A. ROMANO, M. I. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person case. **Zoonoses Public Health**, Malden. v. 57, p. 375–381, 2010.

ESTRADA CHÁVEZ, C; MANCILLA, R; DIAZ, C. A. ; GONZÁLEZ, R. P ; Otero, f. d. Determinacion de anticuerpos anti-PPD em hatos lecheros com distintas prevalências de tuberculosis bovina em México. **Veterinária México AO**, v.32, n. 03, 2001.

FERREIRA NETO, J.S. & BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, v. 11, p. 9-13, 1997.

FRÁGUAS, S.de A ; CUNHA-ABREU,M.S.; FERREIRA, A. M.dos R. et al . Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 15, n. 3, p. 117-121, set./dez. 2008

GRANGE, J.M. & YATES, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection.

Veterinary Microbiology, v. 40, p. 137-151, 1994.

HUCHZERMEYER, H. F. K. A. Tuberculosis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious diseases of Livestock**. United Kingdom: Oxford University Press, 1994. p. 1425-1444. v. 2.

IBRAHIM, S.; CADMUS, S. I. B.; UMOH, J. U.; ALOGI, I.; FAROUK, U. M.; ABUBAKAR, U. B.; KUDI, A.C. Tuberculosis in humans and cattle in Jigawa State, Nigéria, risk factors analysis. **Veterinary Medicine International**, Nova Iorque, v.2012, n. 1, p.1-5, 2012.

IDEXX . Kit para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*.

JONES, M. E. H.; HUBBERT, W. T.; HAGSTAD, H. V. **Zoonosis**: recognition, control, and prevention. Ames, Iowa: Iowa State Press. A Blackwekk Publishing Company, 1995. 369 p.

KUBICA, T.; RUSCH-GERDES, S.; NIEMANN, S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3070-3077, 2003.

LANGENEGGER, J., LEITE, O.G., OLIVEIRA, S. Tratamento intermitente da tuberculose bovina com isoniazida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, p. 55-59, 1991.

LEITE, C. Q. F. Isolation and identification of myco- bacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p.319-323, 2003

LILENBAUM, W. Tuberculose bovina: prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na região dos lagos do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 120- 123, 1998.

LILENBAUM, W. Evaluation of an ELISA – PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 66, p. 191- 195, 1999.

MEDINA, E. 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.

MICHALANY, J. **Anatomia Patológica Geral na Prática Médico-Cirúrgica**. São Paulo: Editora Artes Médicas, 1995. 319 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referências Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 2ª ed. Rio de Janeiro, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Pneumonia Sanitária. **Manual de normas para controle da tuberculose**. 4ª Ed. Brasília, 1995, Série A: Normas E Manuais Técnicos, 13).

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

MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.153-177, 1994.

MOTA, P. M. P .C.; MOTTA, P. M. C.; LOBATO, F. C. F.; LAGE, A. P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LEITE, R. C. Avaliação do tratamento com isoniazida em bovinos infectados naturalmente pelo *Mycobacterium bovis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 581-588, 2004.

NEILL, S. D. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, 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. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from Human to Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3555-3557, 2005.

OIE – **The role of animal health and zoonoses standards on disease control and trade**. [online]. Disponível em <http://www.oie.int/en/for-the-media/editorials/detail/article/the-role-of-animal-health-and-zoonoses-standards-on-disease-control-and-trade-a-thiermann>. Acesso em 21 mai. 2014.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, suppl. 1, p. 1-46, 1995.

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.

PARDO, R. B. Isolation of *Mycobacterium spp.* in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

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

PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888 – 1988, conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 357-399, 1988.

RADOSTITS, O. M.; GA Y, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos e equinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 817-827. 817-827.

REICHMAN, L. & TANNE, J. H. **Timebomb: the global epidemic of mult-drug-resistant tuberculosis**. 1 ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 320 p.

RITACCO, V.; LOPEZ, B.; de KANTOR, I. N.; BARRERA, L.; ERRICO, F.; NADER, A.; Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 50, p. 365-367,1991.

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

RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, p. 77-109, 2006.

RUGGIERO, A. P.; Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico da tuberculose bovina / Ana Paula Macedo Ruggiero. – São Paulo : A. P. M. Ruggiero, 2004.68 f.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A., ROX, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n. 1, p.55-65, 2007.

SAKAMOTO, S. M. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). 1997. 43f. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,USP, São Paulo, 1997.

SALYERS, A. A.; DIXIE, D. W. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. 2. ed. Washington: ASM Press, 2002.

SILVA, E.B. **Diagnóstico da Tuberculose Em Bovinos De Corte Do Estado Do Pará-Brasil**. Dissertação de Mestrado UFPA,2005.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de equinos, bovinos, ovinos e caprinos**. São Paulo: Manole, 1993, v. 1 e v. 2, p. 620, 621, 1218.

The IDEXX M. bovis **Ab Test detects bTB infections missed by other tests**. Adding the IDEXX M. bovis Ab Test to existing control programs can dramatically increase the success of bTB detection, 2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 7^a ed., Ed. Artmed, Porto Alegre, 2005, 827p.

UEKI, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; TELES, M. A. S.; VIRGÍLIO, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L. Micobactérias não tuberculosas: diversidade das espécies no Estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**. São Paulo, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2005.

VORDERMEIER, H. M. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 229-244, 2006.

WEDLOCK, D. N.; SKINNER M. A.; DE LISTE, G. W.; BUDDLE, B. M. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, p. 471-480, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, **Tb deaths increasing in eastern Europe** 2002. Disponível em:< <http://www.who.int/archives/inf-pr-1994/pr94-48.html>>. Acesso em :21 jan. 2014.