

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARIANA ASSUNÇÃO DE SOUZA

**EPIDEMIOLOGIA E DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NA
IDENTIFICAÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS COM TUBERCULOSE,
PARATUBERCULOSE E LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA**

UBERLÂNDIA

2018

MARIANA ASSUNÇÃO DE SOUZA

EPIDEMIOLOGIA E DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NA
IDENTIFICAÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS COM TUBERCULOSE,
PARATUBERCULOSE E LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro
Correia Lima.

UBERLÂNDIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729e
2018

Souza, Mariana Assunção de, 1986
Epidemiologia e diferentes métodos de diagnóstico na identificação de bovinos leiteiros com tuberculose, paratuberculose e leucose enzoótica bovina / Mariana Assunção de Souza. - 2018.
128 f. : il.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.451>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino de leite - Doenças - Teses. 3. Tuberculose em animais - Teses. 4. Leucose bovina - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

EPIDEMIOLOGIA E DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NA
IDENTIFICAÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS COM TUBERCULOSE,
PARATUBERCULOSE E LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

Tese aprovada para obtenção do título
de Doutora no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, da
Universidade Federal de Uberlândia,
pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 26 de Fevereiro de 2018

Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima (Orientadora) – FAMEV/UFU

Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi – FAMEV/UFU

Prof. Dr. César Augusto Garcia - FAMEV/UFU

Prof. Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior – Instituto Federal Goiano

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota – UFRPE

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIANA ASSUNÇÃO DE SOUZA - Nascida em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, em 17 de junho de 1986, filha de Evaldo Tadeu de Souza e Dirce Assunção Valentino de Souza. Médica Veterinária, graduada em 09 de julho de 2010 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) no período de agosto de 2007 a julho de 2009 e participou como membro do Programa de Educação Tutorial (PET) do curso de Medicina Veterinária, no período de setembro 2006 a dezembro 2009. Em 2011 iniciou o mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal, no qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de abril de 2011 a fevereiro de 2013. Em 2013 iniciou o doutorado na mesma instituição, na qual também foi bolsista durante o período de março 2014 a março 2015 pela CAPES. Desde 2015 é professora no curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Tem experiência nas seguintes áreas: medicina veterinária preventiva; doenças infecciosas e epidemiologia veterinária.

"Toda ascensão exige esforço, adaptação e sacrifício.
Toda queda resulta em prejuízo, desencanto e recomeço.
Trabalha-te interiormente, vencendo limite e obstáculo, não considerando
os terrenos vencidos, porém, fitando as paisagens ainda a percorrer"

Joanna de Ângelis

*Aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos.
Meu pai Evaldo e minha mãe Dirce, pelo amor, ensinamentos
e por serem meu maior exemplo de amor e companheirismo.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me agraciar com uma família abençoada, pela oportunidade de vivenciar a experiência do doutorado, por ter me cercado de pessoas iluminadas e me conduzido pelos melhores caminhos.

Aos meus pais Evaldo e Dirce, pelo amor e incentivo incondicional. Obrigada por estarem sempre presentes. Vocês são meu porto seguro, o maior presente que Deus me concedeu.

Aos meus irmãos Patrícia, Nathália, Marcelo e minha cunhada Priscilla, pela amizade, força e por serem sempre apoio nos momentos difíceis.

À minha sobrinha Júlia, que trouxe mais ternura pra minha vida.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Guilherme por todo apoio, carinho e incentivo na conclusão dessa etapa.

À minha querida amiga e orientadora Dra. Anna Monteiro Correia Lima, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, por ser exemplo de ética e integridade. Obrigada por sempre me receber com tanta atenção e carinho. Peço a Deus que lhe dê muita saúde e anos de vida, para que você possa iluminar e transformar a vida de tantos outros alunos que tiverem a oportunidade de trabalhar com você.

Aos amigos Nadia Grandi Bombonato, Pollyanna Mafra Soares e Rafael Quirino Moreira que compartilharam comigo mais de perto as alegrias e dificuldades vividas durante os anos de doutorado.

Às minhas amigas Silvia Ferreira e Jacqueline Ribeiro, pelas conversas, conselhos e por me escutarem tantas vezes.

Aos meus queridos amigos e alunos do Centro Universitário de Patos de Minas Brendhal Almeida Silva, Humberto Junior Filho, Maria Paula Lima Reis, André Luis Azevedo, Camila de Fátima Nascimento e Igor José dos Reis, pela amizade e colaboração nos momentos que precisei.

À família LADOC-UFU pela amizade, acolhimento e por criarem um ambiente tão bom de trabalho.

À médica veterinária Dra. Cristina Corsi Dib do Instituto Biológico de São Paulo pela atenção e enorme contribuição na realização dos isolamentos de *M. bovis*.

À Dra. Eliana Roxo pelas contribuições no capítulo do ELISA de tuberculose.

Ao Dr. Martin José Zumarraga, do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, da Argentina, pela parceria na realização da genotipagem dos

isolados de *M. bovis*. Muito obrigada pela atenção que sempre teve comigo, agradeço o empenho e dedicação na realização das análises.

Aos médicos veterinários: Nélio, Tiago e Lucas por terem cedido os dados referentes aos exames que cada um realiza em suas atividades profissionais.

À todos os produtores rurais e responsáveis técnicos das instituições de ensino, por nos terem permitido a coleta de material e investigação epidemiológica. Meus sinceros agradecimentos aos produtores em que foram identificados bovinos positivos no ELISA de tuberculose, por terem permitido o sacrifício desses animais. Muito obrigada pela colaboração!

Ao doutorando Pedro Albuquerque do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela realização das análises de PCR de Paratuberculose.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), representado pelo médico veterinário Dr. Pedro Mota e Dr. Paulo Martins, que gentilmente nos cederam amostras para isolamento de *M. bovis* e permitiram a realização das análises de PCR de tuberculose.

Ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) da Universidade Federal de Uberlândia, por disponibilizar espaço físico e condições para que o projeto pudesse ser executado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão do apoio financeiro.

Aos professores, técnicos e amigos da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos professores que aceitaram compor esta banca de defesa, Dra. Alessandra Aparecida Medeiro-Ronchi, Dr. César Augusto Garcia, Dr. Rinaldo Aparecido Mota e Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior. Obrigada por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

A tuberculose (TB), paratuberculose (PTB) e leucose enzoótica bovina (LEB) são doenças que acometem o rebanho leiteiro e geram diversos prejuízos na produção. No segundo capítulo dessa Tese, objetivou-se avaliar o desempenho de um teste comercial ELISA de TB. Foram avaliados 1644 bovinos pelo teste cervical comparativo (TCC), e 846 no ELISA *M. bovis* IDEXX. Dos 1644 bovinos 80 (4,8%) foram positivos no TCC e 36 (4,25%) no ELISA *M. bovis*, desses 35 foram negativos e um inconclusivo no TCC. Dos 36 positivos no ELISA *M. bovis*, 27 foram eutanasiados, e no exame macroscópico das carcaças três apresentaram lesões sugestivas de TB, e em apenas dois houve confirmação da doença pelos métodos histológico, microbiológico/PCR. A baixa associação do ELISA *M. bovis* com os resultados obtidos nos exames macroscópico, histológico e isolamento apontam para a fragilidade do desempenho do ELISA em condições *in situ*. No terceiro capítulo pesquisou-se a intercorrência da PTB em bovinos reagentes no TCC de TB. 334 bovinos foram avaliados pelo TCC, ELISA de TB e PTB. Fragmentos de vísceras dos positivos no TCC foram colhidos e avaliados na qPCR *M. bovis* e PCR PTB. 16 bovinos foram reagentes no TCC. Nesses, não foram identificadas lesões macro ou microscópicas sugestivas de TB, e também não foi detectado a presença do DNA de *M. bovis* na qPCR. Em 9 animais identificou-se o DNA de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e em 12 carcaças foram visualizadas lesões características de PTB. Em outros nove animais do rebanho detectou-se anticorpos anti-MAP, e em dezessete anti-*M. bovis*. A infecção por MAP pode ter causado reações inespecíficas na tuberculinização. No quarto capítulo da Tese, avaliou-se a situação epidemiológica da PTB e LEB em rebanhos leiteiros no município de Lagoa Formosa – MG. Foram selecionados 40 rebanhos, e colhidas 236 amostras, as quais foram submetidas aos exames de ELISA PTB e imunodifusão em gel de Agar (IDGA) para LEB. A prevalência da PTB no município foi de 20% (IC 95%: 7,60% – 32,39%) em rebanhos e 6% para animais (IC 95%: 2,98% – 9,02%) já para LEB a prevalência foi de 85% (IC 95%: 82.16% - 87.84%) para rebanhos e 50,42% (IC 95%: 49,51% – 51,32%) para animais. A presença da PTB foi associada aos fatores: idade (OR = 0,088), manejo de criação de bezerros após o nascimento (OR = 41,45) e contato dos bezerros com fezes dos animais adultos (OR = 5,008). A LEB foi associada com a prática de transfusão sanguínea (OR = 2,32) assistência médico veterinária (OR = 2,61) e monta natural (OR = 2,27). Diante a ocorrência de casos de PTB e LEB nos rebanhos estudados, sugere-se maior atenção dos produtores e veterinários na adoção de medidas sanitárias para evitar essas doenças, incorporando elementos de vigilância com base nos riscos identificados no estudo.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; vírus da leucose bovina

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), paratuberculosis (PTB) and enzootic bovine leukosis (EBL) are diseases that affect the dairy herd and cause several losses in production. In the second chapter, the performance of a commercial ELISA TB test was evaluated in dairy herds. A total of 1644 cows were examined by the comparative cervical tuberculin test (CCTT) and 846 in a commercial kit of ELISA *M. bovis* IDEXX. Positives cattle in ELISA *M. bovis* were analyzed in macroscopic, histological and microbiological/PCR tests. Of the 1644 bovines, 80 (4.8%) were positive in CCTT and 4,25% (36/846) in ELISA *M. bovis*, 35 negative and one inconclusive in CCTT. Of the 36 positives in ELISA *M. bovis*, 27 were euthanized. Lesions suggestive of TB were identified in three carcasses on macroscopic test, and in two cases were confirmed by histological, microbiological / PCR methods. The low association of ELISA with the results obtained in macroscopic, histological and isolation, points to the fragility of the ELISA performance in field conditions. In the third chapter we investigated the intercurrent of PTB in bovines reagents in CCTT of TB. For this, 334 cattle were evaluated by CCTT, ELISA TB and ELISA PTB. Viscera fragments from the positives in CCTT were collected and evaluated by qPCR *M. bovis* and PTB PCR. 16 cattle were reactive in CCTT. In these, no macro or microscopic lesions suggestive of TB were identified, and the presence of DNA of *M. bovis* in qPCR was also not detected. However, in 9 animal samples (9/16), the DNA of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) was indentified, and in 12 carcasses (12/16) lesions characteristic of PTB were visualized, which were confirmed by histopathological methods. Antibodies Anti-MAP were detected in seventeen and anti-*M. bovis* in other nine animals of the herd. MAP infection may have caused nonspecific reactions in tuberculin test. In the fourth chapter, the epidemiological situation of PTB and BEL was investigated in dairy herds of Lagoa Formosa - MG. 40 herds were selected and 236 samples were collected, and submitted to ELISA PTB and agar gel immunodiffusion (AGID) for BEL. Prevalence for PTB was 20% (95% CI: 7,60% – 32,39%) for herds and 6% (95% CI: 2,98% – 9,02%) for animals. Prevalence of BEL was 85% (95% CI: 82.16% - 87.84%) for herds and 50.42% (95% CI: 49,51% - 51,32%) for animals. The presence of PTB was associated with: age (OR = 0,088), creation of calves with adults (OR = 41.45) and contact of calves with feces of adult animals (OR = 5.008). BEL was associated with blood transfusion (OR = 2.32), veterinary assistance (OR = 2.61) and natural mount (OR = 2.27). It was concluded that 6% of the bovines presented evidence of infection caused by MAP and 50.42% by BLV. It is suggested that farmers and veterinarians take greater care in adopting sanitary measures for these diseases, incorporating surveillance elements based on the risks identified in the study.

Keywords: *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; bovine leukemia virus

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Prevalência da tuberculose bovina em rebanhos do Brasil.	31
Tabela 2.	Prevalência da paratuberculose bovina em rebanhos do Brasil.	35
Tabela 3.	Prevalência da leucose enzoótica bovina em rebanhos do Brasil.	48

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Resultados dos exames de tuberculinização (TCC), ELISA <i>M. bovis</i> , Inspeção Macroscópica, Histopatológico (HE) e Isolamento de <i>M. bovis</i> (Cultura e PCR) realizados a partir de amostras de bovinos provenientes de propriedades de exploração leiteira da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba - MG, Brasil, 2017.	88
------------------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Resultados do ELISA <i>M. bovis</i> em comparação com o Teste Cervical Comparativo (TCC) para o diagnóstico da tuberculose em bovinos provenientes de um rebanho leiteiro do município de Uberlândia-MG, 2017.	105
------------------	--	-----

CAPÍTULO 4.

Tabela 1.	Número de bovinos examinados por rebanho e sororeagentes para Paratuberculose e Leucose Enzoótica Bovina, em rebanhos leiteiros do município de Lagoa Formosa - MG, 2017.	115
Tabela 2.	Distribuição das vacas com paratuberculose conforme os fatores de risco avaliados, no município de Lagoa Formosa - MG, 2017.	117
Tabela 3.	Distribuição das vacas com leucose conforme os fatores de risco avaliados, no município de Lagoa Formosa - MG, 2017.	120

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Mapa de distribuição mundial da tuberculose bovina no segundo semestre de 2016, para espécies domésticas e selvagens, reportadas à OIE. Fonte: World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) OIE. 23
- Figura 2.** Mapa de distribuição mundial da paratuberculose bovina no segundo semestre de 2016, para espécies domésticas e selvagens, reportadas à OIE. Fonte: World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) OIE. 34
- Figura 3.** Mapa de distribuição mundial da leucose enzoótica bovina no segundo semestre de 2016, para espécies domésticas e selvagens, reportadas à OIE. Fonte: World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) OIE. 43

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Pulmão observado durante a necropsia, com granuloma contendo massa caseosa, de consistência pastosa e amarela, identificada em um bovino (rebanho C) positivo no ELISA *M.bovis*, Minas Gerais, Brasil, 2017. 89
- Figura 2.** Fotomicrografia da amostra de pulmão identificada em um bovino (rebanho C) positivo no ELISA *M.bovis*, Minas Gerais, Brasil, 2017. **A.** Reação granulomatosa caracterizada por necrose caseosa central e circundada por tecido conjuntivo fibroso HE. 10x **B.** Parênquima pulmonar com célula gigante tipo Langhans. Citoplasma amplo e núcleos dispostos na periferia da célula. HE. 40x. 89

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Mucosa duodenal espessada com aspecto avermelhado, enrugado e/ou cerebróide, proveniente de bovino positivo no teste cervical comparativo para tuberculose. 105
- Figura 2.** Linfonodo mesentérico com áreas multinodulares irregulares e brancacentas na região cortical e presença de líquido de aspecto leitoso, proveniente de bovino positivo no teste cervical comparativo para tuberculose. 105

Figura 3. Fotomicrografia de intestino delgado com mucosa e submucosa apresentando infiltrado inflamatório. HE.Obj.4x. 106

Figura 4. Fotomicrografia de linfonodo mesentérico com presença de granuloma. HE. Obj. 4x 106

CAPÍTULO 4.

Figura 1. Localização do município de Lagoa Formosa no estado de Minas Gerais, Brasil. 111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR: Bacilos Álcool Ácido-Resistentes

CMT: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

ELISA: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática

HE: Hematoxilina Eosina

IC: intervalo de confiança

IFN- γ : Interferon gamma

LEB: Leucose Enzoótica Bovina

MAC: Complexo *Mycobacterium avium*

MAP: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mM: Milimolar

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

OIE: World Organisation for Animal Health

OR: *Odds ratio*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: Picomol

PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal

PPD: Derivado Protéico Purificado

PTB: Paratuberculose bovina

qPCR: Reação da Cadeia em Polimerase em Tempo Real

TB: Tuberculose bovina

TCC: Teste Cervical Comparativo

TCS: Teste Cervical Simples

TPC: Teste da Prega Caudal

U: Unidade

UV: Radiação Ultravioleta

VLB: Vírus da Leucose Bovina

VPN: Valor Preditivo Positivo

VPP: Valor Preditivo Negativo

WHO: World Health Organization

µg: Micrograma

µl: Microlitro

µm: Micrômetro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Caracterização do gênero <i>Mycobacterium</i>	20
3.2 <i>Mycobacterium bovis</i>	21
3.3 Epidemiologia e controle da tuberculose bovina	22
3.4 Métodos de diagnóstico da tuberculose bovina	26
3.5 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	32
3.6 Epidemiologia e controle da paratuberculose bovina	33
3.7 Métodos de diagnóstico da paratuberculose bovina	38
3.8 Vírus da leucose enzoótica bovina	41
3.9 Epidemiologia e controle da leucose enzoótica bovina	41
3.10 Métodos de diagnóstico da leucose enzoótica bovina	45
REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO 2 – ELISA indireto como método complementar de diagnóstico da tuberculose bovina.	73
CAPÍTULO 3 – Intercorrência da paratuberculose em bovinos reagentes na tuberculinização.	90
CAPÍTULO 4 – Prevalência e fatores de risco associados à infecção por <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> e pelo vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos bovinos leiteiros.	107
CONSIDERAÇÕES FINAIS	126

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), paratuberculose (PTB) e leucose enzoótica bovina (LEB) são doenças infectocontagiosas crônicas que acometem os bovinos e afetam diretamente os índices de produtividade do rebanho leiteiro (POLLOCK et al., 2006; SUN et al., 2015). As perdas econômicas geradas por essas enfermidades estão relacionadas principalmente à queda na capacidade produtiva, descarte de animais doentes, condenação de carcaça ao abate e embargos às exportações da carne bovina para o mercado internacional (DIGIACOMO, 1992; SKUCE et al., 2012; GARCIA; SHALLOO, 2015).

A TB tem como agente etiológico *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) um membro do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), capaz de causar infecção em diferentes espécies, incluindo o homem (CORNER; GORMLEY, 2012). A doença se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões do tipo granulomatosa e de aspecto nodular (DOMINGO et al., 2014). Estudos realizados recentemente identificaram que o rebanho bovino no Brasil possui prevalência de tuberculose que varia entre 0,36% no Distrito Federal (RIBEIRO et al., 2016) a 9% no estado de São Paulo (DIAS et al., 2016). No estado de Minas Gerais foi observado prevalência de 4,25% (BELCHIOR et al., 2016).

O diagnóstico da TB preconizado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) é o teste de tuberculinização intradérmica (BRASIL, 2006). A principal desvantagem do teste é a falta de especificidade. Estudos mostram que *M. bovis* possui grande similaridade antigênica com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), e isso faz com que os testes de tuberculinização intradérmica para tuberculose possam sofrer interferência da infecção por MAP (SEVA et al., 2014), bem como a influência da infecção por tuberculose nos testes de ELISA para detecção de anticorpos anti- MAP (MARASSI et al., 2005). Outra desvantagem do teste intradérmico é a falha para detectar animais em estado de anergia (VARELLO et al., 2008), que ocorre em animais com evidência de infecção por *M. bovis* e que não demonstram aumento de volume no local de inoculação da tuberculina (SLEDGE et al., 2009).

Considerando a relação inversa entre a resposta imune mediada por células e humoral contra *M. bovis*, os anticorpos são geralmente desenvolvidos em estágios mais avançados e estão relacionados com o progresso da doença (POLLOCK; NEILL, 2002). Embora as análises sorológicas não sejam a primeira escolha no diagnóstico da TB, muitos pesquisadores descrevem o objetivo estratégico desse uso (LILENBAUM; FONSECA, 2006; WATERS et al., 2011), que é baseado na identificação de animais anérgicos (McNAIR et al., 2001) e no aumento dos anticorpos nas etapas mais avançadas da doença (POLLOCK; NEILL, 2002; WELSH et al. 2005).

Outros grupos de micobactérias genotipicamente diferentes das constituintes do CMT formam o Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), que inclui as espécies *M. avium* e *M. intracellulare*. O gênero *M. avium* possui 4 subespécies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) agente etiológico da paratuberculose bovina (WHITTINGTON et al., 2011; BIET; BOSCHIROLI, 2014). Os sinais clínicos da PTB se desenvolvem na minoria dos animais infectados (WHITLOCK, 2009), e são caracterizados por diarreia crônica e intermitente, que leva o animal a perda progressiva de peso e ocasionalmente a morte (YAMASAKI et al., 2010).

A maioria das infecções na PTB se dá através da via fecal-oral (FECTEAU, 2017), mas também pode ocorrer pela ingestão de colostro e leite (NIELSEN; BJERRE; TOFT, 2008). Diversos relatos foram realizados em território nacional, onde foram observadas prevalências de 39,8% no Rio Grande do Sul (GOMES et al., 2002); 60,24% em Goiás (ACYPRESTE et al., 2005); 32,3% em Pernambuco (MOTA et al., 2007); 40% no Rio de Janeiro (YAMASAKI et al., 2010); 11,4% no Espírito Santo (COSTA et al., 2010); 34,5% na Paraíba (VILAR et al., 2015) e 37,9% em São Paulo (FONSECA et al., 2000).

O exame considerado padrão-ouro para o diagnóstico da PTB é o isolamento do agente nas fezes, tecidos ou leite. Para a detecção dos bacilos álcool ácido-resistentes (BAAR) pode-se utilizar métodos de coloração de Ziehl-Neelsen, sendo possível a observação do microrganismo em amostras de fezes ou tecidos (MANNING; COLLINS, 2001). Devido ao crescimento fastidioso de MAP, aliado à baixa sensibilidade da cultura bacteriológica, testes

sorológicos como o teste de fixação de complemento (FC), a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e o ELISA foram desenvolvidos para complementar o diagnóstico padrão (FERREIRA et al., 2002).

A LEB é causada por um RNA vírus denominado Vírus da Leucose Bovina (VLB), pertencente à família *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus*. É a enfermidade neoplásica mais comum em bovinos de leite, caracterizada pela proliferação crônica de linfócitos em bovinos adultos (DOMENECH et al., 2000; RADOSTITS et al., 2002). A LEB possui dois tipos de manifestações: a linfocitose persistente, em que se observa o aumento do número de linfócitos circulantes, e a forma multicêntrica de linfossarcoma (DOMENECH et al., 2000).

A transmissão do VLB pode ocorrer pelas vias vertical ou horizontal. Em comparação com a transmissão vertical, a horizontal é responsável pela maioria das infecções, sendo que a forma iatrogênica, que ocorre por meio de práticas como a reutilização de materiais contaminados, parece ser o principal meio de disseminação do vírus (CAMARGOS; REIS; LEITE, 2004; FLORES, 2007). Estudos sorológicos realizados no Brasil identificaram prevalência de 80,89% em Minas Gerais (AMBRÓSIO, 2015); 27,9% no Espírito Santo (STARLING et al., 2013); 9,7% no Acre; 23% em Rondônia (ABREU et al., 1990); 26% no Pará (MOLNÁR et al., 1999); 9,6% Amazonas (CARNEIRO et al., 2003); 27,8% no Tocantins (JULIANO et al., 2014); 27,8% em Alagoas (PINHEIRO-JUNIOR et al., 2013); 56,34% no Paraná (BARROS-FILHO et al., 2010) e 9,2% no Rio Grande do Sul (MORAES, 1996).

O diagnóstico da infecção pelo VLB é obtido por técnicas sorológicas, isolamento viral e/ou detecção de antígenos virais, enquanto que o diagnóstico da linfocitose persistente e linfossarcomas são realizados por meio de exames hematológicos e clínico-patológicos, respectivamente (RADOSTITS et al., 2002; BARROS, 2007). O teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) é o método que se baseia na detecção de anticorpos contra proteínas e glicoproteínas presentes no soro. Devido ao seu baixo custo, praticidade, especificidade (91%) e sensibilidade (95%), essa técnica tem sido amplamente utilizada pela maioria dos países como teste oficial para certificação e controle de trânsito internacional de bovinos (RADOSTITS et al., 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Abordar os aspectos epidemiológicos e de diagnóstico da Tuberculose, Paratuberculose e Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos leiteiros da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba – MG.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho de um kit comercial de ELISA para Tuberculose em rebanhos bovinos leiteiros livres e naturalmente infectados para tuberculose;
- Calcular a prevalência da Tuberculose, Paratuberculose e Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos bovinos da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba – MG.
- Identificar por meio do teste sorológico ELISA para Tuberculose a ocorrência de bovinos anérgicos à tuberculinização;
- Investigar nos animais reagentes ao ELISA para tuberculose a presença de lesões macro e microscópicas sugestivas de tuberculose, por meio da inspeção sanitária das carcaças e diagnósticos histopatológico e microbiológico;
- Confirmar por meio de testes moleculares a presença do DNA de *Mycobacterium bovis* nos isolados obtidos;
- Pesquisar a intercorrência da Paratuberculose em bovinos reagentes no teste cervical comparativo de tuberculose;
- Identificar os fatores de risco associados à ocorrência da Paratuberculose e Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos leiteiros.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Caracterização do gênero *Mycobacterium*

As micobactérias pertencem à família Mycobacteriaceae, são constituídas de dois gêneros, *Amycolicococcus* e *Mycobacterium*, sendo este último de maior importância clínica (WANG et al. 2010). O gênero *Mycobacterium* pertence à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, é composto por oito espécies que causam a tuberculose, tanto nos animais quanto nos humanos. Os membros cultiváveis podem ser distinguidos em dois grupos: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) e as chamadas micobactérias atípicas ou não tuberculosas pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) (BIET; BOSCHIROLI, 2014).

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* (ainda não isolado no Brasil), *M. cannetti* (não patogênico para o homem), *M. caprae*, *M. pinnipedii* (isolada em focas e leões marinhos), *M. mungi* e *M. microti* (patogênico apenas para a ratazana *Microtis agrestis*) (CORNER; GORMLEY, 2012). As espécies que compõem o CMT possuem estreita relação genética, mas apresentam diferentes propriedades fenotípicas e preferências de hospedeiro, além de variar com relação à área geográfica, à patogenicidade e à resistência a antimicrobianos terapêuticos, o que traz diversas implicações nos âmbitos da saúde pública e defesa sanitária animal (AHMAD; BAYRAKTAR et al., 2011).

Além do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), o gênero *Mycobacterium* compreende o Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), formado por cepas não tuberculosas, as quais fazem parte duas espécies, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*. Baseado em dados genotípicos, fenotípicos e testes bioquímicos a espécie *M. avium* foi subdividida em quatro subespécies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, e *M. avium* subsp. *silvaticum* (BIET; BOSCHIROLI, 2014). *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente causador da paratuberculose, *M. avium* subsp. *avium* causa a tuberculose aviária, podendo causar doença disseminada em humanos imunocomprometidos. *M. avium* subsp. *silvaticum* causa tuberculose em aves

selvagens, pombos, veados e cervos. *M. avium* subsp. *hominissuis* causa infecções em porcos e é também um agente oportunista em imunodeprimidos (TURENE et al., 2008; GLANEMANN et al., 2008).

3.2 *Mycobacterium bovis*

A principal cepa infectante para os bovinos é *M. bovis*, é também a mais virulenta entre as espécies do CMT. Apresenta uma das maiores gamas de hospedeiros conhecidos, podendo ser encontrada em bovinos, caprinos, ovinos, suínos, equinos, cães, gatos, búfalos, raposas e ruminantes selvagens, (RIVERA; GIMÉNEZ, 2010). *M. bovis* pode ainda ser transmitido dos bovinos para os humanos, principalmente por meio do consumo de leite não pasteurizado e por aerossóis, quando no contato próximo dos animais infectados com médicos veterinários, ordenhadores, produtores rurais e trabalhadores de matadouros frigoríficos (MICHEL et al., 2010; TORRES-GONZALEZ et al., 2013).

M. bovis são cocobacilos medindo de 0,3 a 0,6µm de largura por 1 a 4µm de comprimento, microaerófilos, não flagelados, não esporulados, não capsulados e nem formadores de toxina. Essas micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), isto é, quando corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) com fucsina a quente, são capazes de resistir à descoloração com álcool-ácido (CORNER, 1994). O elevado conteúdo lipídico da parede celular de *M. bovis*, que pode atingir até 40% do peso seco das células, é responsável por importantes efeitos biológicos no hospedeiro, como a indução na formação do granuloma, capacidade de sobrevivência dentro da célula do hospedeiro e antigenicidade (POLLOCK; NEILL, 2002).

O agente é hospedeiro-dependente, porém, pode sobreviver por longos períodos no ambiente sob condições favoráveis (BARRERA, 2007; JORGE, 2001). Em estábulos, ao abrigo da luz, *M. bovis* pode sobreviver por vários meses, nas pastagens pode chegar até dois anos, até um ano na água e por até 10 meses em produtos de origem animal contaminados. Infecta os animais independentemente da estação do ano, clima, sexo e região, e quanto mais tempo de vida tiver o animal, maior a probabilidade de contágio (CORRÊA; CORRÊA, 1992). São destruídos pela pasteurização do leite e por agentes

desinfetantes como álcool, hipoclorito de sódio, fenol e formol, mas são sensíveis à ação de agentes físicos, como a radiação ultravioleta e o calor (CASTRO et al., 2009; POLLOCK; NEILL, 2002).

M. bovis e *M. tuberculosis* são as espécies mais fortemente relacionadas geneticamente, com homologia de 99,95%, demonstrando colinearidade e nenhuma evidência de grandes translocações, duplicações ou inversões (GARNIER et al., 2003). As principais diferenças entre elas correspondem às deleções ocorridas no genoma de *M. bovis* e a polimorfismos nucleotídicos únicos em genes que codificam proteínas secretadas e de parede celular (ABALOS; RETAMAL, 2004).

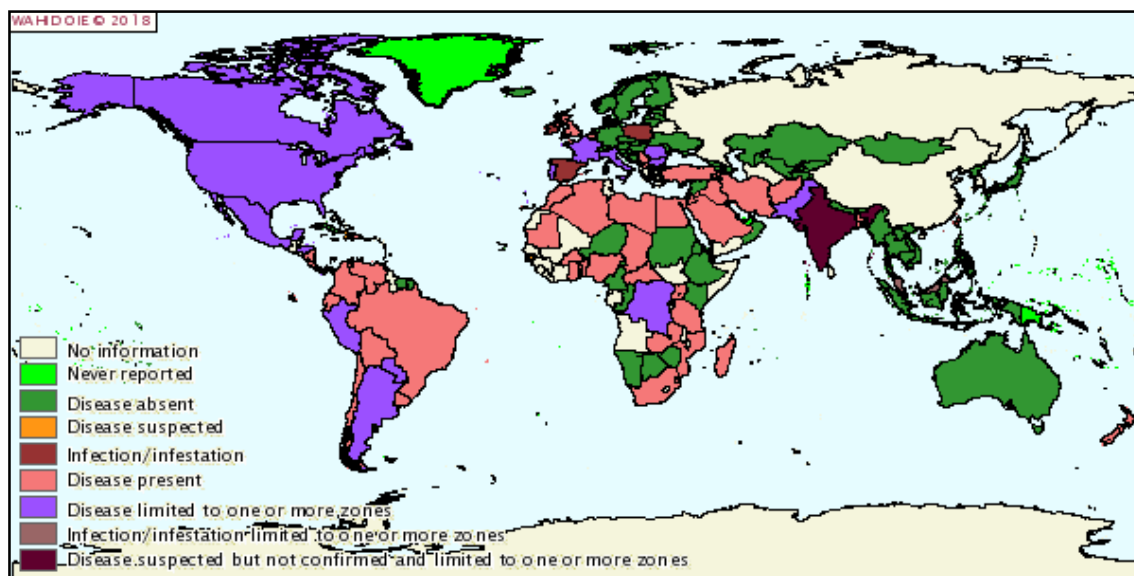
3.3 Epidemiologia e controle da tuberculose bovina

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, com maior prevalência em países em desenvolvimento, onde o conhecimento da epidemiologia da doença e as ações concretas para o seu controle são limitados (REVIRIEGO GORDEJO; VERMEERSCH, 2006).

De acordo com a lista da World Animal Health da OIE referente ao 2º semestre de 2016, sobre a situação epidemiológica da tuberculose no mundo (Figura 1), o Brasil é um dos países que atualmente apresentam a infecção em animais domésticos com manifestações clínicas, assim como Afeganistão, Arábia Saudita, Bolívia, Chile, Colômbia, Costa Rica, Grécia, Guatemala, Irã, Kuwait, Nova Zelândia, África do Sul, Uruguai, Venezuela entre outros (WAHIS, 2016). Austrália, Azerbaijão, República Checa, Dinamarca, Estônia, Finlândia, Israel, Líbano, Lituânia e Suécia são alguns dos países que não relatam casos da doença há no mínimo seis anos. Espanha, Sérvia e Montenegro, Polônia, Irlanda e Fiji são alguns dos países que apresentam infecção pelo agente sem manifestação clínica; Hungria, Argentina, Bulgária, Estados Unidos, França, Itália, México, Paquistão, Portugal, Siri Lanka e Ucrânia a doença foi notificada, mas está limitada a certas regiões desses países. Alguns países como a Espanha, Grécia, Inglaterra, Itália, Irlanda, Portugal, Nova Zelândia, Canadá e EUA não conseguem erradicar dos seus rebanhos a infecção por *M. bovis*, apesar de possuírem eficientes sistemas de detecção de focos e programas de erradicação. Isto se deve, principalmente, à presença do agente em animais

de vida selvagem como gambás, texugo e veado da cauda branca (DE LA RUA-DOMENECH, 2006; MATHEWS et al., 2006; WHITE et al., 2008; WAHIS, 2016).

Figura 1. Mapa de distribuição mundial da tuberculose bovina no segundo semestre de 2016, para espécies domésticas e selvagens, reportadas à OIE. Fonte: World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) OIE.



No Brasil, dados de notificações oficiais da TB referente ao período de 1989 a 1998 indicaram prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados (BRASIL, 2006). Em 1999 a prevalência da TB no estado de Minas Gerais foi estimada em 5.04% (95% IC: 4.96% – 5.13%) por rebanho e 0.81 (95% IC: 0.37% – 1.25%) em animais (BELCHIOR et al., 2016). No último levantamento oficial realizado em 2013, a prevalência estimada foi de 4,25% por rebanho e 0,56% em animais. Este resultado mostra que as ações propostas pelo PNCEBT em Minas Gerais, como a obrigatoriedade de exames para reprodutores em trânsito interestadual e na participação em feiras e exposições, além da certificação voluntária de propriedades livres e monitoradas, não permitiram grandes avanços no controle da doença (BARBIERI et al., 2016).

Ainda que a epidemiologia da tuberculose bovina seja bem entendida, e estratégias para um controle efetivo e eliminação da enfermidade sejam conhecidos há algum tempo, a doença ainda encontra-se amplamente

distribuída. Os últimos levantamentos oficiais, realizados no rebanho bovino envolvendo amostras planejadas, realizados por meio de métodos de diagnóstico preconizados pelo PNCEBT, demonstram que a doença encontra-se presente em vários estados do país, com diferentes prevalências (VENDRAME et al., 2016; LIMA et al. 2016; BAHIANSE et al., 2016; GUEDES et al., 2016; NÉSPOLI et al., 2016; ROCHA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016; BARBIERI et al., 2016; GALVIS et al., 2016; DIAS et al., 2016; VELOSO et al., 2016; SILVA et al., 2016 e QUEIROZ et al., 2016) (Tabela 1).

Sabe-se que a forma de criação, intensiva ou extensiva e a raça dos animais destacam-se como os principais fatores de risco para o aumento da prevalência e da suscetibilidade dos bovinos ao *M. bovis* (AMENI et al., 2006; AMENI et al., 2007). Há indicações de que bovinos *Bos indicus* (Zebu) sejam mais resistentes à infecção do que *Bos taurus* (europeu) (FIRDESSA et al., 2012). A introdução e a manutenção da tuberculose em um rebanho são fortemente influenciadas pelas características da unidade de criação, dentre as quais se destacam os tipos de exploração, o tamanho do rebanho, a densidade populacional e as práticas zootécnicas e sanitárias. Observa-se que a doença é mais freqüente em rebanhos leiteiros do que em rebanhos de corte. Contudo, quando bovinos de corte são mantidos em confinamento ou submetidos a condições naturais de aglomeração, ficam sujeitos às mesmas condições de risco (BRASIL, 2006).

Apesar de infectar grande variedade de espécies animais, *M. bovis* tem como principal reservatório os bovinos (OLIVEIRA et al., 2008; CASTRO et al., 2009), sendo considerado o hospedeiro primário (SABEDOT et al., 2009), além dos bubalinos (FIGUEIREDO, 2010). Os bovinos são susceptíveis à infecção e a doença pulmonar tuberculosa (OLIVEIRA et al., 2008). Equinos, suínos, gatos e primatas não humanos são também susceptíveis para o desenvolvimento da doença. Ovinos, caprinos e cães são relativamente resistentes a infecções por *M. bovis* (HEADLEY, 2002).

Várias espécies da fauna silvestre estão relacionadas à manutenção e transmissão de *M. bovis* em todo o mundo, sendo responsáveis pela reintrodução da doença em explorações livres de tuberculose (DUARTE et al., 2007). Dentre os vários animais infectados por *M. bovis* no mundo são considerados os principais reservatórios silvestres: texugos, gambás e os

cervos (ABRAHÃO, 1999). Esses reservatórios podem dispersar o bacilo tuberculoso por uma variedade de vias como secreções respiratórias, urina ou fezes, sendo que a via de transmissão principal dependerá do tipo de interação entre as populações de diferentes espécies (THOEN et al., 2006).

A via de transmissão mais comum e mais importante de *M. bovis* é a aerógena (O'REILLY; DABORN, 1995), quando o animal inala aerossóis contaminados com o bacilo eliminado por outro animal infectado, o que corresponde a aproximadamente 90% das infecções (NEILL et al., 1994), porém a transmissão depende da geração de aerossóis, da quantidade de bacilos excretados e densidade do rebanho (POLLOCK et al., 2006). Além da eliminação por aerossóis, o animal pode disseminar o agente por descarga nasal, leite, fezes, urina, secreções vaginais e uterinas, e pelo sêmen (POLLOCK; NEILL, 2002), apesar da transmissão congênita e por contato com órgãos genitais ocorrer, elas são raras (NEILL et al., 1994). O trato digestivo também é porta de entrada da infecção, principalmente em bezerros alimentados com leite proveniente de vacas com mastite tuberculosa e em animais que ingerem água ou forragens contaminadas (OLIVEIRA et al., 2008).

O curso da infecção é crônico e a evidência clínica da tuberculose raramente é encontrada, mesmo em casos avançados, quando muitos órgãos podem estar envolvidos. Quando presentes, os sinais clínicos variam. Os linfonodos apresentam-se aumentados de volume, podendo obstruir as vias aéreas, o trato digestivo ou vasos sanguíneos. O envolvimento do trato digestivo algumas vezes se manifesta por diarreia intermitente intercalada por períodos de constipação. Magreza extrema e desconforto respiratório podem ocorrer durante a fase final da doença. Diminuição na produção de leite e dificuldades em se ganhar peso também são relatados (ROXO, 1997).

Informações sobre a ocorrência da enfermidade em humanos a partir do *M. bovis*, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, são escassas (RUGGIERO, 2004). Estudos realizados a partir de revisões da ocorrência de tuberculose zoonótica publicados entre 1954 e 1970 estimaram que a proporção de casos humanos por *M. bovis* eram responsáveis por 3,1% de todas as formas de tuberculose: 2,1% das formas pulmonares e 9,4% das extrapulmonares (COSIVI et al, 1998). Nos países desenvolvidos, atualmente a TB corresponde à aproximadamente 1 a 2% dos casos em humanos (HLAVSA

et al., 2008; MUELLER et al., 2013). Nos países em desenvolvimento, particularmente em regiões mais pobres da África, a TB ainda apresenta alta prevalência e a pasteurização do leite ou as atividades de vigilância sanitária ao abate não são extensivamente praticadas. Nestas regiões, a situação epidemiológica da infecção é semelhante à encontrada no início do século XX, apontando que em média 10 a 20% dos casos de tuberculose humana sejam causados por *M. bovis* (MUELLER et al., 2013), podendo atingir proporções ainda maiores, como 40% em dados anuais (BOBADILLA-DEL VALLE et al., 2015).

O controle da TB é baseado no diagnóstico adequado e eliminação dos animais positivos, junto com a prevenção da disseminação da doença para rebanhos sadios (MORRISON et al., 2000). A estratégia do PNCEBT criado em 2001, consiste em um conjunto de medidas sanitárias compulsórias, associadas às ações de adesão voluntária, que dizem respeito à certificação de propriedades livres e de propriedades monitoradas. O objetivo do programa é diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde dos seres humanos e animais, além de permitir uma melhora na concorrência da pecuária brasileira, de modo a atender às exigências sanitárias dos países importadores (BRASIL, 2006).

3.4 Métodos de diagnóstico da tuberculose bovina

O diagnóstico da TB pode ser realizado por meio de métodos diretos e indiretos. Nos diretos há a detecção e identificação do agente no material biológico, nessa categoria encontram-se as técnicas de histopatologia, com colorações de Ziehl Neelsen, bacteriologia e métodos moleculares. Nos métodos indiretos é pesquisada uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral (produção de anticorpos circulantes) ou celular (medida por linfócitos e macrófagos) (SCHILLER et al., 2010). A reação tuberculínica, o exame histopatológico com coloração de Hematoxilina-Eosina e os testes sorológicos são os representantes dessa categoria (PACHECO et al., 2009).

Pode-se afirmar que existem metodologias adequadas ao desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose

bovina, entretanto, não existe um método de diagnóstico que tenha eficácia absoluta (MASCARENHAS, 2017). A implantação de um programa sanitário de TB prevê a avaliação de um grande número de animais, especialmente em um país com um rebanho grande como é o caso de Brasil. Por isso, na rotina de diagnóstico os testes indiretos desempenham papel fundamental, pela maior praticidade, sendo então o recurso escolhido pelo PNCEBT (BRASIL, 2006).

O método de diagnóstico *in vivo* preconizado para bovinos e prescrito para o comércio internacional é o teste de tuberculinização, que consiste em provas cutâneas indiretas realizadas pela inoculação intradérmica do PPD (Derivado Proteico Purificado), um extrato de antígeno de *M. bovis*. O exame intradérmico possui três modalidades: teste da prega caudal (TPC), teste cervical simples (TCS) e teste cervical comparativo (TCC). O teste da prega caudal e cervical simples são empregados como testes de triagem em pecuária de corte e leite, respectivamente. O teste cervical comparativo é utilizado como teste confirmatório, devido a maior especificidade em relação aos testes simples. O TCC é considerado como tendo aproximadamente 85% de sensibilidade e 98% de especificidade (REBHUN, 2000).

Devido à similaridade antigênica de *M. bovis* com outras micobactérias, tais como *M. avium*, das quais os animais são frequentemente expostos, recomenda-se a utilização dos testes intradérmicos comparativos, nas quais a reação ao PPD preparado com ambas as micobactérias (*M. bovis* e *M. avium*), são comparados. No entanto, os testes comparativos não eliminam todas as reações inespecíficas (COLLINS et al., 1994).

A reação alérgica à tuberculina é uma reação de hipersensibilidade retardada tipo IV mediada por resposta celular e com baixa produção de anticorpos. Essa resposta é desencadeada pela ativação dos macrófagos por interferon gama (IFN γ), interleucina-2 (IL-2) e citocinas liberadas por linfócitos T auxiliares (Th1), aproximadamente dez dias após o início da infecção, e se manifesta macroscopicamente na forma de edema e endurecimento progressivo no local da aplicação da tuberculina, que atinge seu máximo após 72 horas. A intensidade da reação cutânea pode ser mensurada pelo tamanho do edema e do endurecimento da pele (BRASIL, 2006).

Variações inerentes ao teste, tais como dose, conservação e o próprio PPD utilizado, somadas às possíveis variações na execução, leitura e

interpretação do teste, podem contribuir para o aumento de resultados falso-negativos (MONAGHAN et al., 1994). Além disso, falso-negativos podem ocorrer quando o exame é realizado em animais em final da gestação ou pós-parto, com desnutrição, imunossupressão causada pelo uso inadequado de drogas e devido ao fenômeno da anergia (RIVERA et al., 2009; ÁLVAREZ et al., 2012).

Para o exame *post mortem*, estudos bacteriológicos e histopatológicos das lesões macroscópicas permitem controlar o diagnóstico realizado em campo e avaliar a eficácia das provas tuberculínicas (OMS, 1995). A lesão característica da TB é o granuloma composto por coleção de células epitelioides circundadas por uma orla de fibroblastos com linfócitos entremeados, conhecido como tubérculo. Frequentemente o centro do granuloma está necrosado e calcificado. Semelhante a lesões de muitas outras doenças infecciosas, o tubérculo é a reação do hospedeiro aos microrganismos invasores e sua patogênese depende de uma resposta imunológica específica do hospedeiro (JONES et al., 2000).

Apesar das dificuldades na identificação das lesões, uma vez que alguns processos inflamatórios granulomatosos possuem características morfológicas semelhantes às descritas para aquelas advindas da tuberculose (REIS et al., 1995), o exame anatomopatológico é muito importante para o diagnóstico da TB. Isto pode ser confirmado com base nos bons resultados alcançados pelos programas de controle, implantados em regiões com alta prevalência da doença, onde o exame é capaz de detectar 47% das lesões presuntivas de TB em bovinos abatidos (CORNER, 1994; LAGE et al., 1998).

O exame histopatológico é uma ferramenta complementar ao exame *post mortem* das carcaças, com lesões presuntivas de TB. O método consiste na análise de fragmentos de lesões, coletadas em carcaças submetidas à inspeção (CORNER, 1994). O exame pode ser considerado uma técnica direta quando empregado coloração especial de Ziehl Neelsen para visualização de micobactérias, ou indireta, com coloração de hematoxilina-eosina no corte histológico, podendo ser identificado o granuloma (VARELLO et al., 2008). A morfologia e organização do granuloma da TB é caracterizada pela presença de uma cápsula conjuntiva; adjacente a ela há presença de infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente constituídos por macrófagos e

linfócitos; também são observadas células epitelióides, células gigantes tipo Langhans delimitando a área de necrose de caseificação que no seu interior pode conter material amorfo basofílico, resultado da calcificação distrófica (CASSIDY et al., 1999).

O diagnóstico definitivo da tuberculose é realizado mediante o isolamento e identificação do agente por métodos bacteriológicos. As técnicas de isolamento apresentam baixa sensibilidade, devido aos métodos drásticos de descontaminação do material, que além de destruir os contaminantes, podem também matar os bacilos, dificultando seu isolamento (CORNER et al., 1994). Além disso, necessita-se de grande quantidade de bacilos viáveis e longo período de crescimento em meios de cultura apropriados, que pode variar de quatro a seis semanas (ZANINI, et al., 2001).

Os membros do CMT, incluindo *M. bovis*, crescem lentamente quando comparado com os padrões bacteriológicos gerais e requerem longo tempo de incubação, especialmente no isolamento primário (CORNER et al., 2012), que varia aproximadamente de 24 a 40 dias para o aparecimento das primeiras colônias macroscopicamente visíveis (CORNER, 1994; MARCONDES et al., 2006). Assim, apenas em pequena porcentagem de animais suspeitos ou positivos para a enfermidade realiza-se o diagnóstico definitivo (JORGE et al., 2004).

As técnicas moleculares já apresentam aplicação prática dentro dos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, sendo utilizada de forma complementar aos procedimentos bacteriológicos. A utilização de uma metodologia de diagnóstico molecular que permita a detecção rápida de *M. bovis* diretamente em amostras biológicas é uma interessante alternativa para a confirmação de existência da doença, a ser utilizada na vigilância epidemiológica de animais abatidos em matadouros, principalmente pelo longo período necessário para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos (RORING et al., 2000; ZANINI et al., 2001).

A PCR é uma técnica que permite identificar a presença de sequências específicas de DNA micobacteriano, a partir de amostras clínicas ou micobactéria isolada em meio de cultura. Apresenta as vantagens de ser sensível e específica, e de reduzir o tempo de diagnóstico quando comparada aos métodos tradicionais, sendo capaz de detectar poucos bacilos na amostra,

inclusive os inviáveis (ZANINI et al., 2001). Na PCR em tempo real (qPCR) é possível acompanhar a amplificação do fragmento alvo durante os ciclos da PCR. Os ciclos de amplificação são realizados com sondas de hibridização que realçam a especificidade do teste (DORAK, 2006) e tem como vantagem em relação à PCR convencional, maiores precisão, reprodutibilidade, acurácia e velocidade das análises, melhor controle de qualidade no processo, menor risco de contaminação e objetividade na interpretação dos resultados, uma vez que a reação ocorre em um sistema tubular fechado, não havendo a necessidade de eletroforese (NOVAIS et al., 2004; RODRIGUEZ - LÁZARO et al., 2007) e oferece também maior sensibilidade analítica (KRENKE, 2005).

Considerando a relação inversa entre a resposta imune mediada por células e humoral contra *M. bovis*, os anticorpos são geralmente desenvolvidos em estágios mais avançados da tuberculose e estão relacionados com o progresso da doença (POLLOCK; NEILL, 2002).

Testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos provenientes da resposta imune humoral contra *M. bovis* têm sido desenvolvidos (OIE, 2013), dentre os quais o ELISA tem demonstrado grande potencial, pois permite o processamento de um grande número de amostras em curto espaço de tempo, e a amostragem sanguínea pode ser repetida com a frequência necessária sem alterar o estado imune do animal. A interpretação é baseada em valores numéricos e é mais objetiva que a observação da reação de hipersensibilidade na pele do animal (LILENBAUM et al., 2001).

Entretanto os testes sorológicos apresentam alguns problemas quanto a sensibilidade e especificidade, que variam em função do estágio de infecção da doença em que o teste é aplicado, dos antígenos utilizados no ensaio (STRAIN et al., 2011) e a ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de micobactérias (MORRISON et al., 2000). Assim, o desenvolvimento de um teste de sorodiagnóstico requer o conhecimento do mecanismo imune humoral induzido pela infecção com *M. bovis* em bovinos (POLLOCK et al., 2006) e a identificação dos principais antígenos envolvidos na estimulação da produção de anticorpos, pois sabe-se que na tuberculose bovina, múltiplos antígenos são envolvidos e que o reconhecimento desses varia de animal para animal e em função do tempo de infecção (LYASHCHENKO et al., 1998).

Tabela 1. Prevalência da tuberculose bovina em rebanhos do Brasil.

Ano	Autores	Estado	n° animais	Prevalência animais (%)	n° rebanhos	Prevalência rebanhos (%)
2003	RIBEIRO et al., (2016)	Distrito Federal	2.019	0,05	278	0,36
2005-2007	SILVA et al., (2016)	Paraná	16.045	0,42	1.419	2,15
2008-2010	BAHIENSE et al., (2016)	Bahia	18.810	0,21	1.305	1,6
2009	GUEDES et al., (2016)	Mato Grosso Sul	17.121	0,035	938	1,3
2009	NÉSPOLI et al., (2016)	Mato Grosso	28.878	0,12	1.133	1,3
2009-2010	VENDRAME et al., 2016	Rondônia	19.640	0,12	904	2,3
2011	DIAS et al., (2016)	São Paulo	20.278	1,3	1.743	9
2012	VELOSO et al., (2016)	Santa Catarina	11.650	0,06	1.653	0,50
2012-2014	GALVIS et al., (2016)	Espírito Santo	7.699	0,7	637	7,6
2013	BARBIERI et al., (2016)	Minas Gerais	31382	0,56	2182	4,25
2013	QUEIROZ et al., (2016)	Rio Grande do Sul	9.895	0,7	1.067	2,8
2014	LIMA et al (2016)	Pernambuco	5.728	0,62	906	2,87
2014	ROCHA et al., (2016)	Goiás	18.659	0,30	300	3,43

3.5 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) é classificado como um membro do Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC). O MAC é composto pelas espécies, *M. avium* e *M. intracellulare*, sendo que as quatro subespécies que compõem *M. avium* podem infectar grande variedade de hospedeiros e possuem elevado grau de semelhança genética. MAP é o agente responsável pela paratuberculose, doença que pode acometer várias espécies, principalmente ruminantes, além de monogástricos (suínos e cães) e primatas (TURENE et al., 2008; GLANEMANN et al., 2008).

MAP são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), Gram positivos, imóveis e aeróbicos. Assim como outras micobactérias, possuem parede celular espessa, composta principalmente por lipídeos, o que determina sua propriedade álcool-ácido resistente. Geralmente os bacilos aparecem agrupados em diversos tecidos e nas fezes e se encontram no interior de macrófagos e/ou células gigantes de Langhans (COLLINS, 1996). A bactéria é altamente resistente a situações extremas de frio, calor e pH, o que a torna capaz de sobreviver por longos períodos no solo, fezes e água (KLANICOVA et al., 2012). Possui crescimento muito lento, sendo um microrganismo bastante fastidioso. A formação de colônias visíveis em meio sólido pode requerer mais de 4 meses de cultivo (TAYLOR, 1957).

A possível ligação entre MAP e a Doença de Crohn em humanos tem sido objeto de estudos e grandes debates. Embora o MAP não seja considerado uma zoonose, muitos pesquisadores vêm sugerindo a associação entre MAP e a Doença de Crohn (CHIODINI et al., 1984). Grant et al., (2002) avaliaram a viabilidade do MAP, após processamento, utilizando a técnica de pasteurização “*High Temperature Short Time*” (HTST), em amostras de leite naturalmente contaminadas pelo MAP. Os autores verificaram que o agente foi capaz de sobreviver ao processo de pasteurização comercial. Tais resultados estimulam o debate e a possibilidade do MAP ser ingerido pelo homem através de lácteos (GOMES, 2002). Caso o MAP seja colocado na lista de agentes transmitidos por alimentos, as consequências econômicas para a indústria de alimentos podem ser profundas e de grande alcance, principalmente por não

haver estudos sobre o potencial impacto econômico (KENNEDY; BENEDICTUS, 2001).

3.6 Epidemiologia e controle da paratuberculose bovina

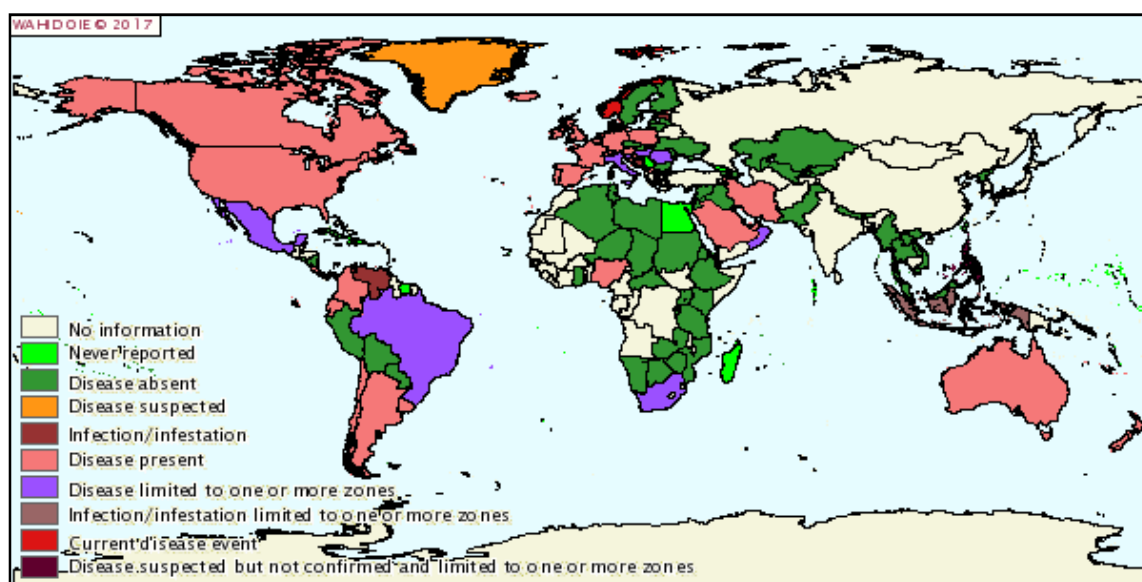
A paratuberculose é uma doença contagiosa crônica do trato intestinal que afeta predominantemente ruminantes domésticos e silvestres (CHIODINI et al., 1984), embora existam diversos estudos demonstrando que muitas espécies animais podem ser infectadas pelo MAP, tanto sob condições naturais quanto experimentais (DIERCKINS et al., 1990; ZWICK et al., 2002). Criações leiteiras são as mais afetadas, pois o confinamento oferece condições para a propagação da infecção entre os animais (NIELSEN; BJERRE; TOFT, 2008).

Em 1895, John e Frothingham publicaram um relato de caso que foi considerado “um caso singular de tuberculose bovina”, denominado inicialmente de pseudotuberculose, depois de doença de John (McFADYEN, 1906) e paratuberculose (BANG, 1910). Em pequenos ruminantes, a doença foi relatada pela primeira vez na Grécia, em 1965 (DIMARELI-MALLI et al., 2013). Na maioria dos casos, a sua ocorrência está associada à animais importados e, em alguns países, tem grande importância como Nova Zelândia, Austrália e Reino Unido (COCITO et al., 1994).

A notificação da paratuberculose à OIE é obrigatória, e de acordo com a base de dados WAHID (*Wordwide Animal Health Information Database*), no segundo semestre de 2016 a doença foi reportada em mais de 50 países, sendo que no Brasil a doença encontra-se limitada a uma ou mais zonas (Figura 2). Na América do Sul aponta-se para uma prevalência de 16,9% entre bovinos, 75,8% em rebanhos bovinos, 16% entre ovinos, 4,3% entre caprinos e 3,7% nos rebanhos caprinos (FERNÁNDEZ-SILVA et al., 2014). Estudos sobre a prevalência da infecção realizados em diferentes países estimaram a prevalência em amostras obtidas em matadouros, e identificaram prevalência de 10% na Inglaterra (KENNEDY; BENEDICTUS, 2001); 10,8% em Winconsin (ARNOLDI et al., 1983); 9% na Califórnia (ABBAS et al., 1983); 5,5% no Canadá (McNAB et al., 1991) e 16% na Nova Zelândia (LISLE; MILLESTONE, 1993). Com base em testes sorológicos, estima-se que a prevalência a nível mundial esteja entre 7% e 55% (TIMMS et al., 2011).

Levantamentos sorológicos realizados em vários países verificaram prevalência de 11,79% na China (SUN et al., 2015); 51% na Argentina (PAOLICCHI et al., 2003); 6,3% na Polônia (SZTEYN; WISZNIEWSKA-LASZCZYCH, 2011); 3,9% na Eslovênia (KÜSAR et al., 2011); 20% nos Estados Unidos (WELLS et al., 1999); 2,3% em Portugal (CORREIA-GOMES et al., 2010); 2% na Áustria (GASTEINER et al., 1999); 32% no gado de leite da Bélgica (BOELAERT et al., 1999); 17% na Inglaterra e Gales (CETINCAYA et al., 1998); 60% na Nova Zelândia (BRETT, 1998); 55% na Holanda (MUSKENS et al., 1999) e 55% no Canadá (NIELSEN; AGGER, 2000).

Figura 2. Mapa de distribuição mundial da paratuberculose bovina no segundo semestre de 2016, para espécies domésticas e selvagens, reportadas à OIE. Fonte: World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) OIE.



No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez, em 1915, em bovinos da raça Flamengo importados da Bélgica, no estado do Rio de Janeiro, (Dupont, 1915). Não há levantamentos oficiais da paratuberculose e os estudos de prevalência são pontuais e geralmente trabalha-se com pequeno número de amostras e rebanhos. Verifica-se relatos da doença em ruminantes em pelo menos 11 estados das 5 regiões do país (RIVEIRA et al., 1996; FONSECA et al., 2000; GOMES et al., 2002; ACYPRESTE et al., 2005; SILVA, 2005; MOTA et al., 2007; RISTOW et al., 2007; COSTA et al., 2010; YAMASAKI et al., 2010; SÁ et al., 2013; VILAR et al., 2015) (Tabela 2).

Tabela 2. Prevalência da paratuberculose bovina em rebanhos do Brasil.

Ano	Autores	Estado	Prevalência animais (%)	Método Diagnóstico
1996	Riveira et al. (1996)	MS	45,5	ELISA
2000	Fonseca et al. (2000)	SP	37,9	ELISA
2002	Gomes et al. (2002)	RS	50	ELISA absorvido
			39,8	ELISA não absorvido
			11,4	IDGA
			3,6	Cultivo fecal
2005	Acypreste et al. (2005)	GO	60,24	ELISA
2005	Silva (2005)	PA	35,4	ELISA
2007	Ristow et al. (2007)	RJ	12,8	ELISA
2007	Mota et al. (2007)	PE	32,3	Isolamento, anatomopatológico e PCR
2009	Costa et al. (2010)	ES	11,4	ELISA
2010	Yamasaki et al. (2010)	RJ	40	ELISA
2012	Sá et al. (2013)	PE	2,7	ELISA
2015	Vilar et al. (2015)	PB	10,7	ELISA

A principal via de transmissão do MAP é a oro-fecal. Os ruminantes jovens são os mais suscetíveis à infecção, que ocorre principalmente através da amamentação no úbere contaminado por fezes de animais doentes (RADOSTITS et al., 2002), embora existam outros meios como a transmissão vertical (WHITTINGTON; WINDSOR, 2009) e a transmissão pelo colostro e leite de vacas infectadas (CHIODINI; HERMON-TAYLOR, 1993). Pastos, água e alimentos contaminados com fezes de bovinos doentes são também importantes meios de transmissão (CHIODINI et al., 1984). O trato reprodutivo masculino pode ser contaminado, embora a transmissão sexual não tenha sido comprovada. O MAP já foi isolado de sêmen fresco e sêmen comercializado congelado (LARSEN; KOPECKY, 1970).

Alguns fatores podem contribuir para a disseminação da PTB nos rebanhos, como por exemplo, o contato dos bezerros com as fezes de animais infectados pelo MAP (DORÉ et al., 2012), a ausência de piquetes maternidade (VILAR et al., 2015), o tamanho do rebanho, (SUN et al., 2015), a taxa de

crescimento anual do rebanho (SÁ et al., 2013), o fornecimento de colostro e leite procedente de vacas doentes (NIELSEN; BJERRE; TOFT, 2008), o manejo de criação (contato de bezerros com adultos), o transporte, parto, elevadas cargas parasitárias e o estresse causado pela ordenha (DUFOUR et al., 2004).

Devido ao longo período de incubação, os animais infectados podem excretar o microrganismo em suas fezes por 15 a 18 meses, antes de surgirem os primeiros sinais clínicos da doença (RADOSTITS et al., 2002). As manifestações clínicas da paratuberculose ocorrem em animais a partir de dois anos; é caracterizada por perda progressiva de peso, apesar dos animais apresentarem apetite normal ou mesmo exacerbado, desidratação, diarreia intermitente, profusa e não responsiva a tratamentos (BEHR; COLLINS, 2010).

A paratuberculose bovina subclínica está associada ao aumento dos sinais inespecíficos como diminuição na produção leiteira, transtornos reprodutivos e maior incidência de mastites (CORPA et al., 1998). O acúmulo de células inflamatórias na mucosa e submucosa do intestino, causa a síndrome da má absorção, o que diminui a absorção de nutrientes, reduz a eficiência produtiva e causa o declínio da condição corporal (CHIODINI et al. 1984; CLARKE, 1997). A manifestação clínica da paratuberculose está associada a situações de estresse como partos, deficiência nutricional e produção de leite elevada (CLARKE, 1997).

A gravidade das lesões pode não corresponder à gravidade dos sinais clínicos. As lesões primárias encontram-se no trato gastrointestinal e nos linfonodos regionais associados; a área mais comumente afetada é a porção terminal do íleo na região da válvula íleocecal e pode ter forma segmentar ou difusa, porém as lesões podem aparecer desde o duodeno até ao reto (CHIODINI et al., 1984).

Na fase precoce da doença, a primeira alteração que se verifica é um ligeiro engrossamento da mucosa ficando esta com um aspeto aveludado. Mais tarde, a parede intestinal engrossa, mostrando-se por vezes edematosa. A mucosa apresenta pregas grossas e largas com disposição transversal e bem compactada. Esta apresentação não desaparece quando o intestino é esticado, sendo denominada de cerebroide por se assemelhar ao córtex cerebral. A mucosa entre as pregas pode estar avermelhada devido a congestão ou

ulceração. A superfície peritoneal do íleo pode apresentar pequenos nódulos brancos calcificados ou caseosos (CHIODINI et al., 1984; GILARDONI et al., 2012; SALEM et al., 2013).

As lesões linfáticas compreendem linfadenite e linfangite. Chiodini et al. (1984) relata que os linfonodos mesentéricos ficam aumentados, edematosos, pálidos, quase sem distinção corticomedular e com vários locais de inflamação granulomatosa. Os linfonodos mais afetados encontram-se na região ileocecal. Os vasos linfáticos assemelham-se a cordões engrossados que percorrem o peritônio intestinal e o mesentério até aos linfonodos e podem apresentar os mesmos nódulos brancos calcificados ou caseosos (SALEM et al., 2013). Também podem ocorrer lesões noutros órgãos, principalmente no fígado, onde podem aparecer granulomas focais que podem passar despercebidos. Também podem ocorrer lesões vasculares, nomeadamente arteriosclerose (CHIODINI et al., 1984).

O sucesso no controle da paratuberculose depende da implementação, à longo prazo, de mudanças na gestão do rebanho. Em rebanhos negativos, o objetivo é permanecer livre do MAP. Para isso, os rebanhos precisam ser manejados de modo fechado, sem a introdução de animais de outros rebanhos ou participação em leilões ou feiras onde exista potencial contato com animais infectados. Para rebanhos infectados, o objetivo é trabalhar para reduzir a prevalência da infecção. As principais estratégias são: (1) prevenir novas infecções, (2) gerenciar bovinos infectados adequadamente, e (3) melhorar a resistência ao MAP (FECTEAU, 2017).

A gestão dos piquetes maternidades é um aspecto importante para prevenir novas infecções. Deve proceder-se à separação do bezerro e vaca logo à nascença para diminuir a probabilidade de transmissão fecal-oral. Deve-se interditar a entrada de animais com qualquer tipo de doença na maternidade e a densidade animal deve ser baixa, ou, se possível, deve haver maternidades individuais. Os espaços têm de ser mantidos limpos, não esquecendo comedouros e bebedouros, mudando-se a cama diariamente. Os bezerros devem ser limpos regularmente, tendo especial atenção aos flancos, membros, úbere e tetos (GARRY, 2011; SWEENEY et al., 2012).

3.7 Métodos de diagnóstico da paratuberculose bovina

O diagnóstico da doença pode ser realizado pela identificação do agente etiológico ou detecção da resposta imune a esse agente (MANNING; COLLINS, 2001). Vários métodos podem ser utilizados como: cultura fecal, testes imunológicos baseados na resposta imune celular e humoral, exames moleculares como a PCR e método histopatológico (ROUSSEL et al., 2007).

O isolamento do agente por meio da cultura fecal é a técnica considerada “padrão-ouro” para o diagnóstico da paratuberculose com 100% de especificidade, apesar da baixa sensibilidade e longo tempo necessário para serem observadas as primeiras colônias (CHIODINI et al., 1984). Nielsen e Toft (2008), estimam que a sensibilidade do exame varia com a fase da doença em que o animal se encontra, sendo estimada em 70% no caso de animais em fase clínica ou aproximadamente 23 a 29% quando se consideram os animais infectados. O MAP apresenta o crescimento mais fastidioso dentre todas as micobactérias, com o período de incubação de até 8 - 16 semanas, o que pode levar meses até o diagnóstico final (LILENBAUM et al., 2007). Os meios de cultura ideais para o MAP são o Löwenstein-Jensen e o meio Herrolds's egg yolk medium (HEYM), enriquecidos com micobactina. O processamento laboratorial é trabalhoso e o tempo de crescimento do microrganismo é demorado, levando aproximadamente 8 a 12 semanas a 37° C (RISTOW et al., 2007).

O diagnóstico *ante mortem* da PTB tem sido um ponto crítico em estratégias de controle. Ainda não há teste padrão para o diagnóstico da paratuberculose devido à natureza crônica da enfermidade e aos diferentes estágios da doença. A resposta imune é uma característica comum das doenças causadas pelas micobactérias (CHIODINI et al. 1984). As provas baseadas na detecção da resposta humoral frequentemente mostram resultados negativos nas fases iniciais da infecção, porém são positivas nas fases finais da doença quando a carga antigênica é considerável. O contrário se dá quando os testes de imunidade celular produzem resultados negativos nos estágios mais avançados ou no estado de anergia da doença. É improvável que o diagnóstico da paratuberculose por meios indiretos possa se basear na detecção de um único tipo de resposta imune (STABEL, 2010).

Existem dois tipos de provas imunológicas para o estudo de MAP. As que detectam a resposta humoral e as que detectam a resposta celular. A resposta imune celular está associada ao período inicial da infecção, sendo esta progressivamente substituída pela resposta humoral à medida que a infecção avança e começam a ser observados os primeiros sinais clínicos (TIMMS et al., 2011).

No exame intradérmico avalia-se a reação de hipersensibilidade causada pela inoculação de jonina ou PPD aviário (YAMASAKI et al., 2013). O exame foi o teste mais utilizado no passado para detecção da infecção precoce (KALIS et al. 2003), no entanto, o uso é limitado, devido à falta de especificidade. A reação à PPD aviária está associada à exposição ou infecções causadas por diversos agentes do complexo *Mycobacterium* (*M. bovis*, *M. avium* e MAP) e por *Nocardia farcinus* (LILENBAUM et al., 2007). A exposição à micobactérias saprófitas presentes no ambiente, também pode sensibilizar os animais, resultando em reações de hipersensibilidade do tipo tardia inespecífica (SCOTT et al. 2010). O teste intradérmico é considerado positivo quando há um aumento na espessura da pele maior que 3 mm, no local da inoculação, após 24 a 72 horas (NIELSEN et al., 2001).

Anticorpos específicos contra o MAP começam a ser detectados na fase subclínica da doença, quando a infecção já está bem estabelecida e disseminada, mas ainda não há sinais clínicos (FECTEAU, 2017). Podem ser usados testes de fixação de complemento, imunodifusão em gel de ágar e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). O teste a que mais utilizado na rotina é o ELISA, que identifica unicamente a resposta humoral (GILARDONI et al., 2012). Estes ensaios tornam-se muito sensíveis quando a produção de anticorpos é mais elevada, pois a sensibilidade dos testes de detecção de anticorpos aumenta com a progressão da doença (TIMMS et al., 2011).

O soro para o teste ELISA pode ser obtido a partir de amostras de sangue ou leite. Existe uma grande variedade de testes ELISA, utilizando diferentes antígenos para a detecção de anticorpos anti-MAP. Assim sendo, a sensibilidade do ELISA também varia, podendo ir de 7 a 39% quando se consideram todos os animais infectados e de 50 a 87% quando os animais já apresentam sinais clínicos. Dependendo do teste, a especificidade encontra-se entre os 85 a 100% (NIELSEN; TOFT, 2008).

O exame histopatológico constitui-se na observação das lesões específicas em amostras de tecido como o íleo, intestino (visualização de placas) e linfonodos mesentéricos (normalmente alargados e edematosos) (OIE, 2014), e são caracterizadas por enterite, linfangite e linfadenite granulomatosas (DRIEMEIER et al., 1999). Nota-se infiltrado de elementos histiocitários de núcleos vesiculosos, cujas células são volumosas, os limites não são nítidos; entre elas encontram-se numerosas células gigantes de Langhans. Na subserosa encontram-se capilares linfáticos dilatados e ocupados, por aglomerados de células gigantes (CLARKE, 1997). Verifica-se ainda vasos sanguíneos intestinais dilatados repletos de hemácias assim como ectasia dos vasos linfáticos da subserosa do intestino e mesentério, e ocupados por rede de fibrina ou por elementos histiocitários. Na maioria das vezes o infiltrado é formado por linfócitos, em permeio a raros neutrófilos e plasmócitos. Nos linfonodos mesentéricos observa-se a substituição da zona cortical por infiltrados difusos das células macrofágicas com numerosos gigantócitos, distribuídos ao acaso. Pode ser observada a infiltração destas mesmas células na zona cortical e paracortical dos linfonodos mesentéricos (CLARKE, 1997; CHIODINI et al., 1984; DRIEMEIER et al., 1999).

Avanços na área de biologia molecular, em particular, no desenvolvimento da reação em cadeia de polimerase (PCR), têm oferecido novos suportes para o desenvolvimento de um teste rápido, sensível e específico. No caso da paratuberculose, a identificação de uma sequência de inserção conhecida como IS900, considerada única para MAP, tem facilitado a utilização do PCR na detecção desse organismo em fezes e em tecidos (COLLINS et al., 1993). No genoma de MAP pode-se encontrar 14 a 20 cópias da IS900, o que confere a testes que a utilizem uma sensibilidade superior em relação a outras sequências (TIMMS et al., 2011).

Foi relatado que a sensibilidade da PCR para amostras de fezes é igual ao da cultura, com maior especificidade, devido aos *primers* utilizados (KAWAJI et al., 2007). A PCR em tempo real possibilita maior eficiência na detecção do agente, quando comparado a PCR convencional. A técnica oferece a vantagem de menor risco de contaminação cruzada; maior sensibilidade e especificidade que é reforçada pela utilização de sondas e a possibilidade de quantificar o agente (MACKAY, 2004).

3.8 Vírus da Leucose enzoótica bovina

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença crônica causada pelo vírus da leucose bovina (VLB), pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae* e gênero *Deltaretrovirus*, que infecta principalmente linfócitos tipo B (RADOSTITS et al., 2002; BARROS, 2007). A palavra retro (reverso) origina-se da enzima transcriptase reversa e como em todos os retrovírus, por ação dessa enzima, o RNA viral é convertido em DNA pró-viral, o qual se integra ao genoma da célula hospedeira. Tal fenômeno contribui para que a infecção torne-se permanente (RAJÃO, 2008).

O vírus mede de 90-120nm de diâmetro e é constituído por um capsídeo icosaédrico, envelope lipoglicoproteico e genoma RNA fita simples. As glicoproteínas presentes no envelope possuem importante função biológica no ciclo de replicação por modularem a adsorção do vírus à célula alvo, determinando o tropismo e a especificidade viral. A glicoproteína 51 (gp51) presente no envelope do VLB é responsável pela infectividade do vírus, sendo a ligação da gp51 a um receptor específico na célula a etapa inicial da infecção (LEUZZI JUNIOR; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

Radiações ultravioleta, congelamento e descongelamentos repetidos, assim como o aquecimento a 56° durante 30 minutos inativam o vírus (BARROS, 2007). O vírus pode permanecer viável por até duas semanas em sangue armazenado à 4°C. Solventes e detergentes lipídicos, tais como o álcool, éter e clorofórmio inativam os retrovírus (BRAGA et al., 1997).

3.9 Epidemiologia e controle da leucose enzoótica bovina

A LEB encontra-se distribuída mundialmente, observa-se maior disseminação entre animais de exploração leiteira em relação aos animais destinados a produção de carne, sendo essa maior susceptibilidade associada ao tipo de manejo e aglomeração (BIRGEL JUNIOR et al., 2006; DEL FAVA; PITUCO, 2004). A infecção ocorre com maior frequência em animais com mais de 24 meses, essa maior frequência não deve ser atribuída a maior susceptibilidade desses animais e sim ao maior tempo de permanência dos

bovinos mais velhos nos rebanhos e, por isso, submetidos a exposição prolongada pelo vírus (RAJÃO et al., 2012).

De acordo com Birgel Junior et al. (2006), a partir dos seis meses de vida o percentual de animais positivos aumenta gradativamente com o progredir da idade, passando de 1,07% no grupo etário formado por animais com idade entre 6 e 12 meses, para 13,52%, no gado com 48 a 72 meses de idade e atingindo nos animais acima de 72 meses o percentual de 32,72%.

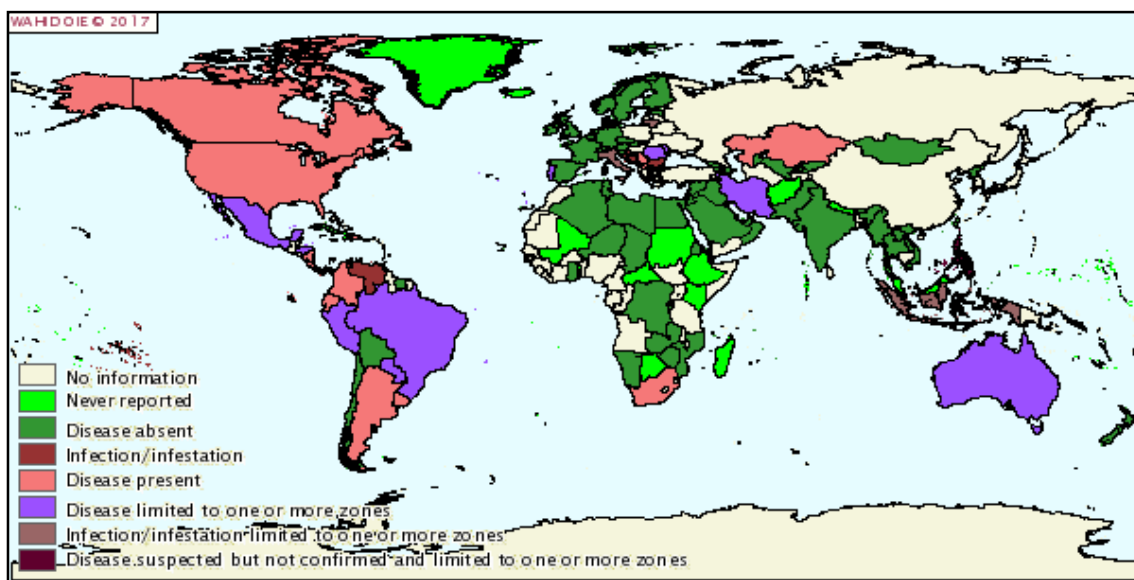
O vírus possui caráter endêmico em diversos países, embora já existam regiões e países, como Alemanha, Dinamarca, Finlândia e a região baixa da Silesia, na Polônia, que erradicaram a infecção (NUOTIO et al., 2003; OTACHEL-HAWRANEK, 2007).

A prevalência da LEB no mundo é bastante variável, com índices de 32,85% na Argentina (TRONO et al., 2001); 49,3% na Colômbia (PENA et al., 1985); 20% na Bolívia (LOPEZ et al., 2010); 34,3% na Venezuela (MARIN et al., 1978); 3,3% no Japão (USUI et al., 2003); 11,0% na Turquia (UYSAI et al., 1998); 18,29% na China (SUN et al., 2015); 26,9% no Canadá (SCOTT et al., 2006), e 48% nos EUA (USDA, 1997). Dados de notificação oficial reportados à OIE até o 2º semestre de 2016 revelam que na América do Sul, Brasil, Peru e Paraguai, bem como México na América Central, a doença encontra-se limitada a uma ou mais zonas. Estados Unidos, Canadá, Colômbia, Equador, Argentina e Uruguai, a doença estava presente. Bolívia, Chile e Guiana Francesa a doença não foi reportada (Figura 3).

No Brasil o primeiro relato da infecção ocorreu em 1943, por Rangel e Machado (1943), a introdução foi atribuída à importação de animais por produtores do Sul e Sudeste, espalhando-se para demais regiões devido o trânsito intenso de animais (ABREU et al., 1994). A avaliação da prevalência pelo VLB foi iniciada nos rebanhos dos estados da região Sudeste, por Alencar Filho (1979), que identificou prevalência de 60% em rebanhos leiteiros criados em São Paulo. A partir de então, diversos estudos de prevalência foram realizados no Brasil, demonstrando a distribuição da LEB pelos rebanhos bovinos do país (CARNEIRO et al., 2003; MOLNÁR et al., 1999; SANTOS, 2010; FERNANDES et al., 2009; PINHEIRO-JUNIOR et al., 2013; MATOS; BIRGEL JUNIOR; BIRGEL, 2005; JULIANO et al., 2014; HEIDMAN et al., 2015;

BIRGEL JUNIOR, et al., 2006; AMBRÓSIO, 2015; ROMERO; ROWE 1981; BARROS FILHO et al., 2010; FRANDOLOSO et al., 2008) (Tabela 2).

Figura 3. Mapa de distribuição mundial da leucose enzoótica bovina no segundo semestre de 2016, para espécies domésticas e selvagens, reportadas à OIE. Fonte: World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) OIE.



Os únicos animais infectados naturalmente são os bovinos, bubalinos e capivaras, entretanto já foi demonstrado em infecções experimentais que outras espécies como ovinos e caprinos podem ser infectados, porém o efeito patogênico é diferente (BIRGEL JUNIOR et al., 2006). Animais assintomáticos e os que apresentam sinais clínicos são capazes de eliminar o agente por meio das excreções e secreções corporais, como: secreções nasal e traqueal, urina e principalmente, sangue, leite e saliva (JOHNSON e KANEENE, 1992).

A transmissão do VLB ocorre de forma vertical, mas preferencialmente por via horizontal, de forma iatrogênica, sendo necessários apenas 2.500 linfócitos (0,05µL de sangue) para que, através de inoculação, ocorra a infecção. Procedimentos inadequados de palpação retal, vacinação, reutilização de agulhas contaminadas com sangue, colheita ou transfusões de sangue, além de fômites contaminados usados em procedimentos cirúrgicos, podem difundir intensamente o VLB entre os animais (KOHARA et al., 2006; FLORES, 2007; FERNANDES et al., 2009).

A transmissão horizontal do vírus é favorecida pelo convívio íntimo e prolongado de animais, que vivem em condições de estresse. O VLB pode ser também transmitido por tabanídeos em decorrência de alternância alimentar em diferentes hospedeiros, assim acredita-se que estes insetos desempenhem papel importante na propagação da doença, principalmente em regiões com altas temperaturas, onde a proliferação é maior (SILVA et al., 2008; DIGIACOMO, 1992; FLORES 2007). De acordo com Braga et al. (1998), a transmissão através da inseminação artificial só ocorrerá se o sêmen for contaminado com sangue durante a colheita.

A transmissão vertical da LEB pode ocorrer pela via uterina ou mesmo oral através da ingestão de colostro e leite contendo linfócitos contaminados com o BLV. Bezerros de mães infectadas podem ser infectados ao nascerem ou pela ingestão de colostro e leite (DIGIACOMO, 1992). Soropositividade entre 3 a 20% em bezerros recém-nascidos antes da ingestão do colostro, já foi comprovada por Leuzzi Junior; Alfieri; Alfieri (2001) e Del Fava e Pituco (2004).

A maioria dos bovinos infectados permanece assintomática. Aproximadamente um terço dos animais infectados desenvolvem doença crônica proliferativa, chamada de linfocitose persistente, em que o número de linfócitos B se eleva acentuadamente. A formação de linfomas pode ser observada em até 5% dos animais acometidos, geralmente após longo período de infecção, em animais acima de cinco anos de idade. Os sinais clínicos mais frequentes são: inapetência, indigestão, diarreia, perda de peso, partos distócicos, exoftalmia, paralisia de membros e alterações neurológicas por compressão de nervos (CAMARGOS et al., 2004).

Os principais fatores de risco relacionados à elevação na frequência de animais infectados nos rebanhos nacionais e do mundo são: presença de insetos hematófagos, histórico de animais com leucemia, comercialização de animais (KOBAYASHI et al., 2014), idade, tamanho do rebanho, raça (SEVIK; AVCI; ÍNCE, 2015), presença de animais provenientes de outras propriedades (SUN et al., 2015), assistência técnica, aquisição recente de gado, ausência de piquete maternidade, transfusão sanguínea e manejo inadequado do colostro (PINHEIRO JUNIOR, et al., 2013; SILVA et al., 2008). Além disso, a ausência de uma política sanitária nacional visando combater a ocorrência da doença contribui para a disseminação da LEB nos rebanhos (GARCIA et al., 1991).

Devido ao fato da infecção ser na maioria das vezes inaparente e, principalmente, pela não visualização dos prejuízos econômicos relacionados ao VLB, percebe-se a dificuldade na implantação de um programa de controle, sendo o comprometimento para a implantação do programa por parte dos proprietários, fator essencial para redução na prevalência da doença (MENDES et al., 2011).

O monitoramento realizado por meio de exames sorológicos periódicos pode auxiliar na adoção de medidas que permitam controlar a doença no rebanho. Exames sorológicos na entrada de animais e a eliminação gradativa dos positivos podem ser determinantes no controle da LEB (FORLETTI et al., 2013).

Braga et al. (1997), analisaram a eficiência de três métodos de controle da infecção pelo VLB em rebanhos leiteiros: (1) eliminação dos soropositivos; (2) segregação do rebanho e (3) manejo misto. Os autores concluíram que a eliminação dos positivos só é viável quando a prevalência da doença é baixa, sendo necessário o acompanhamento sorológico, pois a permanência de um animal infectado é fonte de infecção para os demais. A segregação entre bovinos positivos e negativos embora pouco prático mostrou-se eficaz, possibilitando a eliminação fracionada dos infectados. Já o manejo misto mostrou-se inviável em curto prazo, possivelmente pela dificuldade em seguir as medidas preventivas.

3.10 Métodos de diagnóstico da leucose enzoótica bovina

O diagnóstico da LEB é fundamental para o controle e erradicação da doença, podendo ser realizado pela identificação de alterações hematológicas, caracterizadas pelo aumento no número de linfócitos (linfocitose persistente), pelo isolamento viral a partir do cultivo em células de pulmão fetal bovino, onde aparecerão sincícios, sorologicamente, pela identificação de anticorpos específicos contra o antígeno do VLB, ou pela PCR para detecção direta do genoma viral ou do provírus (LEUZZI JUNIOR, ALFIERI, ALFIERI, 2001). Dentre as técnicas para pesquisa de anticorpos, as mais comumente utilizadas são: o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), a reação de fixação de

complemento, a soroneutralização, o ELISA e o radioimunoensaio (EVERMANN, 1992).

A praticidade, o baixo custo e a especificidade tornaram o teste IDGA o método mais amplamente utilizado para o diagnóstico da LEB na maioria dos países, porém alguns pontos negativos foram detectados: o teste teria baixa sensibilidade de detectar animais com baixos títulos de anticorpos; animais infectados recentemente e vacas gestantes próximos de três semanas que antecedem o parto e vaca com duas semanas de puerpério (MELO; MARQUES JUNIOR, 1993). O teste de IDGA também não teria a capacidade de diferenciar anticorpos transferidos de forma passiva para os bezerros via colostro de anticorpos de uma infecção ativa (LEUZZI JUNIOR, ALFIERI, ALFIERI, 2001).

Um estudo comparativo entre as técnicas de IDGA e ELISA foi realizado para diagnosticar o VLB utilizando como teste confirmatório o Western blotting (WB). Os resultados mostraram semelhança de especificidade entre os testes, porém, o ELISA apresentou maior sensibilidade quando comparado ao IDGA. O teste de ELISA apresenta como vantagem adicional a possibilidade da análise de um grande número de amostras simultaneamente (DOLZ; MORENO, 1999). Para os trabalhos de erradicação da LEB a técnica de ELISA é a mais indicada pela maior sensibilidade e praticidade (LEUZZI JUNIOR, ALFIERI, ALFIERI, 2001).

A realização de exames histopatológicos em bovinos infectados pode ser útil na caracterização da apresentação tumoral (YAMAMOTO et al., 1982). As lesões típicas no adulto aparecem geralmente em animais com idade superior a três anos. Nestes o desenvolvimento de tumores volumosos e nodulosos, localizados em serosas, tecido conjuntivo frouxo e em nódulos linfáticos sugerem neoplasias em áreas relacionadas ao sistema linfático. O envolvimento do baço e a infiltração de leucócitos no fígado estão presentes em casos em que observa-se a manifestação leucêmica em sangue periférico (LEUZZI JUNIOR, ALFIERI, ALFIERI, 2001).

A PCR é uma técnica conveniente para detectar o DNA proviral em amostras de sangue, suspensões de órgãos e material tumoral, sendo um método sensível que permite o diagnóstico rápido e precoce (BALLAGI-PORDÁNY et al., 1992). Recomenda-se a PCR para confirmar resultados da

sorologia quando forem analisados animais jovens com a presença de anticorpos colostrais; em caso de tumor para diferenciar entre linfoma esporádico e infeccioso; casos com resultado duvidoso no ELISA; novas infecções antes que possam ser produzidos anticorpos; e em bovinos utilizados na produção de vacinas (EVERMANN, 1992).

Tabela 3. Prevalência da leucose enzoótica bovina em rebanhos do Brasil.

Ano	Autores	Estado	n° animais	Prevalência animais (%)	n° rebanhos	Prevalência rebanhos (%)
1999	CARNEIRO et al., (2003)	Amazonas	661	8,9	16	100
1999	MOLNÁR et al., (1999)	Pará	668	26	14	85
2009	SANTOS, (2010)	Maranhão	920	53,80	92	98,91
2006	FERNANDES et al., (2009)	Pernambuco	881	37	38	94,7
2008	PINHEIRO-JUNIOR et al., (2013)	Alagoas	341	27,8	17	70,6
2003	MATOS; BIRGEL JUNIOR; BIRGEL (2005)	Bahia	796	41	13	100
2006	JULIANO et al., (2014)	Tocantins	489	27,8	12	100
2006	JULIANO et al., (2014)	Goiás	562	15,3	11	81,9
2011-2012	HEIDMAN et al., (2015)	Mato Grosso	280	11,78	10	100
2005	BIRGEL JUNIOR et al., (2006)	São Paulo	476	9,24	7	85
2014	AMBRÓSIO, (2015)	Minas Gerais	1392	80,89	10	100
1981	ROMERO; ROWE (1981)	Rio de Janeiro	1444	53,3	12	100
2007	BARROS FILHO et al., (2010)	Paraná	268	56,34	5	100
2008	FRANDOLOSO et al., (2008)	Rio Grande do Sul	200	38,5	26	61,5

Referências

ABALOS, P.; RETAMAL, P. Tuberculosis: una zoonosis re-emergente? **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics), v. 23, n. 2, p. 583- 594, 2004. <https://doi.org/10.20506/rst.23.2.1502>

ABBAS, B.; RIEMANN, H. P.; HIRD, D. W. Diagnosis of Johne' s disease (paratuberculosis) in Northern California cattle and a note of its economic significance. **California Veterinarian**, v. 37, p. 2024, 1983.

ABRAHÃO, R.M.C.M. Tuberculose Humana causada pelo Mycobacterium bovis: Considerações gerais e importância dos reservatórios animais. Archives of Veterinary Science, v.4, n.1, p.5-15, 1999.

ABREU, J. M. G.; ARAUJO, W. P.; BIRGEL, E. H. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v.17, n.1, p.67-90, 1994.

ABREU, V. L. V.; SILVA, J. A.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina nos Estados de Rondônia e Acre. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 3, p. 203-210, 1990.

ACYPRESTE, C. S.; JULIANO, R. S., RIVEIRA, F. E. B.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; DIAS-FILHO, F. C. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-Mycobacterium paratuberculosis em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1 p. 55-59, 2005.

AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical and Developmental Immunology**, Bethesda, v.2001, p. 819-943, 2011.

ALENCAR FILHO, R. A.; MAZANTI, M. T.; SAAD, A. D.; POHL, R. Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucemia linfática crônica (LLC) dos bovinos no estado de São Paulo, **Biológico**, v. 45, n. 3, p. 47-54, 1979.

ALVAREZ, J.; PÉREZ, A.; BEZOS, J.; MARQUÉS, S.; GRAU, A.; SAÉZ, J.L.; MÍNGUEZ, O.; DE JUAN, L.; DOMÍNGUEZ, L. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. **Veterinary Microbiology**, v.155, n.1, p.38-43, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.034>

AMBRÓSIO, N. A. **Intercorrência da leucose enzoótica bovina e mastite em vacas leiteiras naturalmente infectadas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

AMENI, G.; ASEFFA, A.; ENGERS, H.; YOUNG, D.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Cattle husbandry in Ethiopia is a predominant factor affecting the pathology of bovine tuberculosis and gamma interferon responses to mycobacterial antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 9, p. 1030–1036, 2006. <https://doi.org/10.1128/CVI.00134-06>

AMENI, G.; ASEFFA, A.; SIRAK, A.; ENGERS, H.; YOUNG, D. B.; HEWINSON, G. R.; VORDERMEIER, M. H.; GORDON, S. V. Effect of skin testing and segregation on the incidence of bovine tuberculosis, and molecular typing of *Mycobacterium bovis* in Ethiopia. **Veterinary Record**, v. 161, p. 782–786, 2007.

ARNOLDI, J. M.; HURLEY, S. S.; LESAR, S. Johne' s disease in Wisconsin cattle. **Veterinary Laboratory Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 493-496, 1983.

BAHIENSE, L.; BAVIA, M. E.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; GRISI FILHO, J. H. H.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3549-3560, 2016.

BALLAGI-PORDÁNY, A.; KLINTEVALL, K.; MERZA, M.; KLINGEBORN, B.; BELÁK S. Direct detection of bovine virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. **Journal Veterinary Medicine**, v.39, p.69-77, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01140.x>

BANG, O. Avian tuberculin as a diagnostic agent in chronic infection enteritis of cattle. **Manedsskrift for Dyrlaeger**, v. 21, p. 561-570, 1910.

BARBIERI, J.M.; OLIVEIRA, L. F.; DORNELES, E. M. S.; MOTA, A. L. A. A.; GONÇAVES, V. S. P.; MALUF, P.P.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F.; DIAS, R.A.; TELLES, E. O.; GRISI FILHO, J. H. H.; HEINEMANN, M. B.; AMAKU, M.; LAGE A.P. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil, 2013. **Semina: Ciências Agrárias**, v.5, p.3531-3548, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3531>

BARRERA L. The basis of clinical bacteriology. In: PALOMINO, J.C., LEÃO, S.C., RITACCO, V. **Tuberculosis**, p. 93-112, 2007.

BARROS, C. S. L. Leucose Bovina, In: RIET CORREA, F.; SCHILD A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, p.159 169. 2007.

BARROS FILHO, I. R.; GUIMARÃES, A. K.; SPONCHIADO, D.; KRÜGER, E. R.; WAMMES, E. V.; OLLHOFF, R. D.; DORNBUSCH, P. T.; BIONDO, A. W. Soroprevalência de anticorpos para o vírus de Leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 511-515, 2010.

BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. Paratuberculosis: Organism, disease, control. **CAB international**, Cambridge. 375p. 2010.
<https://doi.org/10.1079/9781845936136.0000>

BELCHIOR, A. P. C.; LOPES, L. B.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in Minas Gerais State, **Brazilian Tropical Animal Health and Production**, v. 48 n. 2 p. 373-378, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0961-x>

BIET, F.; BOSCHIROLI, M. L. Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p. 69-77, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.08.007>

BIRGEL JUNIOR, E. H.; DIAS, W. M. C.; SOUZA, R. M.; POGLIANI, F. C.; BIRGEL, D. B.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em animais da raça Simental, criados no Estado de São Paulo. **ARS Veterinária**, v.22, n.2, p.122-129, 2006.

BOBADILLA-DEL VALLE, M.; TORRES-GONZÁLEZ, P.; CERVERA HERNÁNDEZ, M.E.; MARTÍNEZ-GAMBOA, A.; CRABTREE-RAMIREZ, B.; CHÁVEZ-MAZARI, B.; ORTIZ-CONCHI, N.; RODRÍGUEZ-CRUZ, L.; CERVANTES-SÁNCHEZ, A.; GUDIÑO-ENRÍQUEZ, T.; CINTA-SEVERO, C.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; DE LEÓN, A.P. Trends of Mycobacterium bovis isolation and first-line anti-tuberculosis drug susceptibility profile: a fifteen-year laboratory-based surveillance. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1-11. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004124>

BOELAERT, F.; WALRAVENS, K.; VERMEERSCH, J.P.; RASKIN, A.; DUFEY, J.; GODFROID, J. Prevalence of paratuberculosis (Johne' s disease) in the Belgian cattle population. In: **Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis**. Australia, p.76-88, 1999.

BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; HALFEN, D. C.; VIDOR, T. Avaliação de métodos de controle da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v.27, n.4, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781997000400019>

BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; SCHUCH, L. F.; HALFEN, D. C. Infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV). **Ciência Rural**. V.28, n.1, p.163-172, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781998000100029>

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da brucelose e tuberculose – PNCEBT. Brasil: MAPA/DAS/DAS, 184p. 2006.

BRETT, E. John's disease: an economic evaluation of control options for the New Zealand livestock industries. Agriculture, New Zealand, Wellington. 73p, 1998.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 435-446, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00228-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00228-6)

CAMARGOS, M. F.; REIS, J. K. P.; **Leite, R.C. Bovine Leukemia Virus**. Virus Reviews & Research, v. 9 n. 1, p. 44-59, 2004.
<https://doi.org/10.17525/vrrjournal.v9i1.221>

CARNEIRO, P. A. M.; ARAÚJO, P. W.; BIRGEL, E. H.; SOUSA, K. W. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas. **Acta Amazônia**, v. 33, p. 111-125, 2003.
<https://doi.org/10.1590/1809-4392200331125>

CASTRO, K. G.; LIEVORE, J. P. M.; CARVALHO, G. D. Tuberculose bovina: diagnóstico, controle e profilaxia. **PUBVET**, Londrina, v.3, n. 30, Art. 648, 2009.

CASSIDY, J.P., BRYSON, D. G., POLLOCK, J. M., EVANS, R. T., FORSTER, F., NEILL, S.D. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis* - inoculated Calves. Journal of Comparative Pathology, v.121, p.321–337, 1999.
<https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0330>

CETINKAYA, B.; ERDOGAN, H. M.; MORGAN, K.L. Prevalence incidence and geographical distribution of John's disease in cattle in England and the Welsh borders. **Veterinary Record**, v. 143, p. 265-269, 1998.
<https://doi.org/10.1136/vr.143.10.265>

CHIODINI, R. J.; VANKRUININGEN, H. J.; MERKAL, R.S. Ruminant paratuberculosis (John's disease): The current status and future prospects. FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. Semina: Ciências Agrárias, v. 37, n. 5, p. 3549-3560, 2016. 74:218-262, 1984.

CHIODINI, R.J.; HERMON-TAYLOR, J. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. Journal of **Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 629-631, 1993.
<https://doi.org/10.1177/104063879300500424>

CLARKE, C.J. The pathology and patogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. **Journal of Comparative Pathology**. 116:217-261, 1997.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80001-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80001-1)

COCITO, C.; GILOT, P.; COENE, M.; DE KESEL, M.; POUPART, P.; VANNUFFEL, P. Paratuberculosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 7, p. 328-345, 1994. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.3.328>

COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.M.; DE LISLE, G.W. Comparison of polymerase chain reactions tests and faecal culture for detecting Mycobacterium paratuberculosis in bovine faeces. **Veterinary Microbiology**, v. 36, p. 289-299, 1993. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90095-O](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90095-O)

COLLINS, D. M.; RADFORD, A. J.; DE LISLE, G.W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology os bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p.83-94, 1994.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90048-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90048-5)

COLLINS, M. T. Diagnosis of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practise**, v.12, n.2, p.357-371, 1996.
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30411-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30411-4)

CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, n. 1-2, p.53-63, 1994.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90046-9)

CORNER, L. A. L.; GORMLEY, E. Mycobacterial infections in multiple species: Implications for diagnosis and control. **Veterinary Journal**, v. 191, n. 2, p.141-142, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.021>

CORNER, L. A. L.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D. U. Primary isolation of Mycobacterium bovis from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 162-171, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.016>

CORPA, J.M.; GARCÍA MARÍN, J.F.; PÉREZ, V. Diagnóstico de paratuberculosis en ganado vacuno. **Medicina Veterinaria**, v. 15, p. 618-623, 1998.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Mads, p. 213-215, 1992.

CORREIA-GOMES, C; MENDONÇA, D.; NIZA-RIBEIRO J. Risk associations to milk ELISA result for paratuberculosis in dairy cows in northern Portugal using a multilevel regression model. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.161, p.295-301, 2010.

COSIVI, O.J.M.; GRANGE, C.J.; DABORN, M.C.; RAVIGILONE, T.; FUJIKURA, D.; COUSINS, R.A.; ROBINSON, H.F.A.K.; HUCHZERMEYER, I.; DE KANNTOR, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Disease*, v.4, p.59-70, 1998.
<https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>

COSTA, J.C.M.; PIERI, F.A.; SOUZA, C. F.; ESPESCHIT, I. F.; FELIPPE, A. G.; SANTOS, G. M.; TOBIA, F. L.; SILVA JUNIOR, A.; MOREIRA, M. A. S. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subesp. paratuberculosis em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1491-1494, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000600028>

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures, and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, p. 77-109. 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M. Infecção pelo Vírus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v.66, n.1/2, p.1-8, 2004.

DIAS, R. A.; STANOJLOVIC, F. M. U.; BELCHIOR, A. P. C.; FERREIRA, R. S.; GONÇALVES, R. C.; BARÃO, R. S. C.; SOUSA, P. R.; SANTOS, A. M. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GRISI FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p.3673- 3684, 2016.
<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3673>

DIERCKINS, M.S.; SHERMAN, D.M.; GENDRON-FITZPATRICK, A. Presumptive paratuberculosis in a Sicilian ass. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 28, p. 459-461, 1990.

DIGIACOMO, R. F. The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. **Veterinary Medicine**, n. 3, p. 248-257, 1992.

DIMARELI-MALLI, Z.; MAZARAKI, K.; STEVENSON, K.; TSAKOS, P.; ZDRAGAS, A.; GIANTZI, V.; PETRIDOU, E.; HERON, I.; VAFEAS, G. Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n.1, p.49-53, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.03.010>

DOLZ, G.; MORENO, E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine*, v. 46, n. 8, p. 551-558, 1999.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1999.tb01248.x>

DOMINGO, M.; VIDAL, E.; MARCO, A. Pathology of bovine tuberculosis. **Research in veterinary Science**, v. 97, p. 520-529, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>

DORAK, T. **Real-time PCR**. Newcastle University, UK, Taylor & Francis Group, p.362, 2006.

DORÉ, E.; PARÉ, J.; CÔTÉ, G.; BUCZINSKI, S.; LABRECQUE, O.; ROY, J. P.; FECTEAU, G. Risk factors associated with transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis to calves within dairy herd: a systematic review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n.1, p. 32-45, 2012.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00854.x>

DOMENECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L.; JESÚS PAYÁ, M.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCÍA, E. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n.1, p. 109-118, 2000. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-109>

DUARTE, E. L.; DOMINGOS, M.; ALBUQUERQUE, T.; AMADO, A.; BOTELHO, A. BOVINE tuberculosis transmission between domestic and feral species in Portugal: first molecular evidences in Mycobacterium bovis isolates from a farm in Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**. v. 102, p. 299-303, 2007.

DUFOUR, B.; POUILLLOT, R.; DURAND B. A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. **Veterinary Research**, v.35, n.69-81, 2004.

DUPONT O. **Nota do Jornal do Commercio de 5 de novembro de 1915**, p.8. 1915.

DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F.; GOMES M. J. P.; CORBELLINI, G.; LORETTI, A. P.; COLODEL, E.M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n.3/4, p.109-115, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1999000300004>

EVERMANN, J. A look at how Bovine Leukemia Virus infection is diagnosed. **Veterinary Medicine**, v.87, p. 272-278, 1992.

FECTEAU, M. E. Paratuberculosis in cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practise**, 2017.

FERNANDES, C. H. C.; DE MELO, L. E. H.; DA S. TENÓRIO T.G.; MENDES, E.I.; DE FERNANDES, A.C.C.; RAMALHO, T.R.R.; MOURA SOBRINHO, P.A.; MOTA R.A. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.3, p.327-334, 2009.

FERNÁNDEZ-SILVA, J.A.; CORREA-VALENCIA, N. M.; RAMÍREZ, N. F. "Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean." **Tropical animal health and production**, v. 46, n.8, p. 1321–1340, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s11250-014-0656-8>

FERREIRA, F.; FONSECA, L.; LILENBAUM, W. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Letters in applied microbiology**, v. 35, n.3, p.173-175, 2002.
<https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01149.x>

FIGUEIREDO, E.E.S., CARVALHO, R.C.T., SILVESTRE, F.G., LILENBAUM, W., FONSECA, L.S., SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41 p.386-390, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200020>

FIRDESSA, R.; REA TSCHOPP, R.; WUBETE, A.; SOMBO, M.; HAILU, E.; ERENDO, G.; KIROS, T.; YAMUAH, L.; VORDERMEIER, M.; R. GLYN HEWINSON, R. G.; YOUNG, D.; GORDON, S. V.; SAHILE, M.; ASEFFA, A.; BERG, S. High prevalence of bovine tuberculosis in dairy cattle in Central Ethiopia: Implications for the dairy industry and public health. **Plos One**, v. 7, p. 1-12, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052851>

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 888p. 2007.

FONSECA, L. F. L.; OLIVAL, A. A.; PEREIRA, C. C.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; SANTOS, M. V. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p.51–56, 2000.

FORLETTI A, JULIARENA MA, CERIANI C, AMADIO AF, ESTEBAN E, GUTIÉRREZ SE. Identification of cattle carrying alleles associated with resistance and susceptibility to the Bovine Leukemia Virus progression by real-time PCR. **Research Veterinary Science**, v. 95 n.3, p.991-5, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.07.018>

FRANDOLOSO, R.; ANZILIEIRO, D.; SPAGNOLO, J.; KUSE, N.; FIORI, K.; SCORTEGAGNA, G. T.; BARCELLOS, L.J. G.; KRUTZ, L. C. Prevalência de Leucose Enzoótica Bovina, Diarréia Viral Bovina, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Neosporose Bovina, em 26 propriedades leiteiras da região Nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n.4, p.1102-1106, 2008.

GALVIS, J. O. A.; GRISI FILHO, J. H. H; COSTA, D.; SAID, A. L. P. R.; AMAKU,

M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p.3567-3578, 2016.

<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3567>

GARCIA, A. B.; SHALLOO, L. The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n.8, p.5019-39, 2015.

<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241>

GARCIA, M.; D'ANGELINO, J. L.; BIRGEL, E. H. Leucose bovina no Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 1, p. 31-42, 1991.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; HEWINSON, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, p. 7877-7882, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>

GARRY, F. Control of paratuberculosis in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practise*. v.27, n.3. p.599-607, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.006>

GASTEINER, J.; WENZL, H.; FUCHS, K.; JARK, U.; BAUMGARTNER, W. Serological Cross-sectional Study of paratuberculosis in Cattle in Austria. **Journal of Veterinary Medicine**, v.46, p. 457-466, 1999.

<https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.1999.00256.x>

GILARDONI, L.R.; PAOLICCHI, F.A.; MUNDO, S.L. Cattle Paratuberculosis: A Review of the Advantages and Disadvantages of Different Diagnostic Tests, **Revista Argentina de Microbiología**, v.44, p.201–215, 2012.

GOMES M.J.P.; DRIEMEIER D.; RIBEIRO V.R., WUNDER JR. E.A., ASANOME W., LANZON L.F.; WALD V.B. Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região Sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.2, p.113-118, 2002.

GLANEMANN, B.; SCHÖNENBRÜCHER, H.; BRIDGER N.; ABDULMAWJOOD A, NEIGER R, BÜLTE M. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. **Journal of Veterinary International Medicine**. v.22, n.5, p.1090-1094, 2008.

GRANT, I.R.; HITCHINGS, E.I.; MCCARTNEY, A.; FERGUSON, F.; ROWE, M.T. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 602-607, 2002.

<https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.602-607.2002>

GUEDES, I. B.; BOTTENE, I. F. N.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LEAL FILHO, J. M.; HEINEMANN, M. B.; AMAKU, M.; GRISI FILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3579-3588, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3579>

HEADLEY, S. A. Systemic bovine tuberculosis: a case report Tuberculose bovina: um relato de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.1, p. 75-79, 2002. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2002v23n1p75>

HEIDMAN, M. J.; FISCHER, V. L.; CASTRO, B. G. Ocorrência de anticorpos antivírus da leucose enzoótica bovina em animais da região médio-norte Mato-Grossense, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.82, p.1-4, 2015. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000792013>

HLAVSA, M.C.; MOONAN, P.K.; COWAN, L.S.; NAVIN, T.R.; KAMMERER, J.S.; MORLOCK, G.P.; CRAWFORD, J.T.; LOBUE, P.A. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 186-175. 2008. <https://doi.org/10.1086/589240>

JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine Leukaemia Vírus and Enzoitic Bovine Leukosis. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p.287-312, 1992.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6ª ed. São Paulo Editora Manole, 2000.

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

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

JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; ELSNER, W. M.; BRITO, D.; ABREU, U. G. P.; SOUZA, S. N. Soroepidemiologia da leucemia bovina (LEB) em bovinos curraleiros dos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.3, p.289-295, 2014. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v15i313369>

KALIS, C. H.; COLLINS, M. T.; HESSELINK, J. W.; BARKEMA, H. W. Specificity

of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: The Johnin skin test and the gamma interferon assay.

Veterinary Microbiology, v.97, p.73-86, 2003.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.07.003>

KAWAJI, S.; TAYLOR, D. L.; MORI, Y.; WHITTINGTON, R. J. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.36–48, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.002>

KENNEDY, D.J.; BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. **Revue Scientifique et Technique Office International Épizooties**, v. 20, n.1, p. 151-179, 2001.

<https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1274>

KLANICOVA.B.; SLANA, I.; ROUBAL, P.; PAVLIK, I.; KRALIK, P. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods.

International Journal of Food Microbiology, v.157, n.2, p.150-155, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.021>

KOHARA, J.; KONNAI, S.; ONUMA, M. Experimental transmission of bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.54, n.1, p.25-30, 2006.

KOBAYASHI, S.; HIDANO, A.; TSUTSUI, T.; YAMAMOTO, T.; HAYAMA, Y.; NISHIDA, T.; MUROGA, N.; KONISHI, M.; KAMEYAMA, K.; MURAKAMI, K. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: a nationwide survey. **Research in Veterinary Science**, v.96, n.1, p.47–53, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.014>

KRENKE, B.E. **Development of a novel, fluorescent, two primers approach to quantitative PCR**. Profiles in DNA, Promega Corporation, v.8, n°.1, pp.3-5, 2005.

KÜSAR, D.; OECEPEK, M.; LOGAR, K.; PATE, M.; KRT B. Seroprevalence of cattle paratuberculosis in Slovenia in 2008 and a comparison of data from current and previous studies. **Slovenian Veterinary Research**. v.48, n.2, p.39-44. 2011.

LAGE, A.P.; LOBATO, F.C.F.; MOTA, P.M.P.C.; GONÇALVES, V.S.P. **Atualização em tuberculose bovina**. FEP-MVZ, 65p, 1998.

LARSEN, A. B.; KOPECKY, K. E. *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p. 255-258, 1970.

LEUZZI JUNIOR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e virus da leukemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**. v.22, n.2, p.211-221, 2001. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2001v22n2p211>

LILENBAUM, W.; FONSECA, L. S.; PESSOLANI, M.C.V.; The use of Ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, n. 161-166, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00437.x>

LILENBAUM, W.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W. M. R. Paratuberculosis: an update. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.580-590, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400001>

LILENBAUM, W.; FONSECA, L. S. The use of ELISA as a complementary tool for bovine tuberculosis control in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n. 2, p.256-261, 2006. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26507>

LIMA, P. B.; NASCIMENTO, D. L.; ALMEIDA, E. C.; PONTUAL, K. A. Q.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GONÇALVES, V. S. P.; TELLES, E. O.; GRISI FILHO, J. H. H.; HEINEMANN, M. B.; SILVA, J. C. R.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiological characterization of bovine tuberculosis in the State of Pernambuco, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 37, n. 5, p. 3601-3610, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3601>

LISLE, G.W.; MILESTONE, B.A. The economic impact of Johne' s disease in New Zealand. In: Johnes disease. **Current Trends in Research Diagnosis and Manegement**. Milner, A.R. & Wood, P.R. Eds, CSIRO. Melbourne, Australia p. 41-46, 1993.

LOPEZ, R.; SUZUKI, K.; GONZALEZ, E.T.; RUIZ, G. LOZA, A.; COCA, C.; PEREIRA, J.A.C.; PECORARO, M.R. Seroprevalence Against Bovine Leukaemia Virus in Dairy Cattle in Bolivia. **International Journal of Dairy Science**, v.5, p.271-275, 2010. <https://doi.org/10.3923/ijds.2010.271.275>

LYASHCHENKO, K. P.; POLLOCK, J. M.; COLANGELI, R.; GENNARO, M. L. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5344-5449, 1998.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.190– 212, 2004.

MARCONDES, A.G.; SHIKAMA, M.L.M; VASCONCELLOS, S.A.; BENITES, N.R.; MORAIS, Z.M.; ROXO, E. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de Mycobacterium bovis em amostras de campo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.

<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26484>

MCFADYEAN, J. Annual report for 1906 of the principal of the Royal Veterinary College. **Journal of the Royal Agricultural Society of England**, v. 67, p. 230-241, 1906.

McNAB, W. B.; MEEK, A.H.; DUNCAN, J.R.; MARTIN, S.W.; VAN DREUMEL, A. A. An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario: study design and prevalence estimates. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 246-251, 1991.

MANNING, E. J. B; COLLINS, M. T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties**. v. 20, p. 133-150, 2001.
<https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1275>

MARASSI, C. D.; FONSECA, L. S.; RISTOW P.; FERREIRA R., LILENBAUM, W. OELEMANN, W. M. R. Improvement of an in house ELISA for bovine Paratuberculosis serology in Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, p. 118-122, 2005.

MARIN, D.; DELOPEZ, N.M.; ALVAREZ, L.; LOZANO, O.; ESPANA, W.; CASTANOS, H.; LEON, A. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. **Annales De Recherches Veterinaires**, v.9, p. 743-746, 1978.

MASCARENHAS, D.R. **Validação da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* em amostras de leite cru**. 94f. 2017. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2017.

MATHEWS, F.; LOVETT, L.; RUSHTON, S.; MACDONALD, D.W. Bovine tuberculosis in cattle: reduced risk on wildlife-friendly farms. **Biology Letters**, v.2, n.2, p.271-274, 2006. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0461>

MATOS, P. F.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre resultados do teste de Elisa e imunodifusão em gel de Agar. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.42, p.171-180, 2005.
<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2005.26428>

McNAIR, J.; CORBETT, D. M.; GIRVIN, R. M.; MACKIE, D. P.; POLLOCK, J. M. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis. MPB83 is an early target with diagnostic potential. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 53, p. 365–371, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2001.00874.x>

MELO, M.M.; MARQUES JUNIOR, Imunossupressão associada a gestação em

novilhas holandesas com leucose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, n.6, p.617-620, 1993.

MENDES, E. I.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G. S.; SÁ, L. M.; SOUTO, R. J. C.; FERNANDES, A. C. C.; SANDES, H. M. M.; SILVA, T. I. B. Intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.1-8, 2011.

MICHEL, A.L.; MULLER, B.; VAN HELDEN, P.D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? **Veterinary Microbiology**, 140:371-378, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.029>

MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. T.; SILVA, A. O. A.; VALE, W. G. Ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n.1, p.7-11, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1999000100002>

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. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90050-7)

MORAES, M.P. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 257-262, 1996. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781996000200015>

MORRISON, W.I.; BOURNE, F.J.; COX, D.R.; DONNELLY, C.A.; GETTINBY, G.; MCINERNEY, J.P.; WOODROFFE, R. Pathogenesis and diagnosis of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. **Veterinary Record**, v.146, n.9, p.236-242, 2000.

MOTA, R. A.; PINHEIRO-JR, J.W.; GOMES M.J.P.; PEIXOTO, R.M.; MAIA, F. C. L.; BRITO, M. F.; CHIES, J. A. B.; SNEL, G. G. M.; BERCHT, B. S.; JUFFO, G. D. Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p. 73-79. 2007.

MUELLER, B.; DURR, S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; LAISSE, C.J.; PARSONS, S.D.; VAN HELDEN, P.D.; ZINSSTAG, J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, p.899-908. 2013. <https://doi.org/10.3201/eid1906.120543>

MUSKENS, J.; BARKEMA, H.W.; RUSSCHEN, E.; VAN MAANEN, K.; SCHUKKEN, Y.H.; BAKKER, D. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. In: **Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis**. International Association for Paratuberculosis. Melbourne, Austrália, p. 207-212, 1999.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of

Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 41-52, 1994. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90045-0)

NÉSPOLI, J. M. B.; NEGREIROS, R. L.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; GRISI FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3589-3600, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3589>

NIELSEN, S. S.; AGGER, J. F. Prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. In: **Proceedings of 9th International Society of Veterinary Epidemiology and Economics**. Breckenridge, Colorado. Colorado State University, USA, 2000.

NIELSEN, S. S.; BJERRE, H.; TOFT, N. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4610–4615, 2008. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1272>

NIELSEN, S.S.; NIELSEN, K. K.; HUDA, A.; CONDRON, R.; COLLINS, M.T. Diagnostic techniques for paratuberculosis. **Bulletin of the International Dairy Federation**. n.362/2001, 13p. 2001.

NIELSEN, S.S.; TOFT, N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-(assay and fecal culture techniques. **Veterinary Microbiology**, n.129, p.217–235, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. Revista Biotecnologia, **Ciências e Desenvolvimento**. Ed. 33, jun-dez 2004.

NUOTIO, L.; RUSANEN, H.; SIHVONEN, L.; NEUVONEN, E. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 59, p.43-49, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00057-6)

OIE, 2014, World Organisation for Animal Health, **International Paratuberculosis (Johne's Disease)**. In OIE Terrestrial Manual Chapter 2.1.11, 2014.

OIE. 2013, World Organisation for Animal Health, **Bovine tuberculosis**. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.4.7, 2013.

OLIVEIRA, V. M.; FONSECA, A.H.; PEREIRA, M.S.J.; CARNEIRO, A.V., JESUS, V.L.T.; ALVES, P.A.M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, pp. 574-579, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000300008>

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, 46 p., 1995.

OTACHEL-HAWRANEK, J. Erradication of enzootic bovine leucosis in dairy cattle from the lower Silesia Region. **Bull Veterinary Institute pulawyn**. v. 51, p. 465-469, 2007.

PAOLICCHI, F.A.; ZUMARRAGA, M.J.; GIOFREE, A.; ZAMORANO, P.; MORSELLA, C.; VERNA, A.; CATALDI, A.; ALITO, A.; ROMANO, M. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. **Journal Medicine Veterinary**, v.50: p.20-26. 2003.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00606.x>

PACHECO, A. M.; HAMZÈ, A. L.; PEREIRA, M. F. B.; PEREIRA, D. M.; CIPRIANO, R. E. P.; LOT, R. F. S. Tuberculose bovina – Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.07, n.03, 2009.

PENA, N.E.B.; MARINO, O. C. J.; PEREZ, H.J.R.; LUNA, V.M.S. Prevalência serologica de leucosis bovina en ganaderias lecheras del centro de Caldas durante 1983. **Revista ICA**, v.20, p.106-115, 1985.

PINHEIRO-JUNIOR, J. W.; SOUZA, M. E.; PORTO, W. J. N.; LIRA, N. S. C.; MOTA, R. A. Epidemiologia da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (LEB). **Ciência Animal Brasileira**. v.14, n.2, p. 258-264, 2013.
<https://doi.org/10.5216/cab.v14i2.18255>

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **Veterinary Journal**. v.163, p.115–127, 2002.
<https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0655>

POLLOCK, J. M.; RODGERS, J. D.; WELSH, M. D.; MCNAIR, J. Pathogenesis of bovine tuberculosis. The role of experimental models of infection. **Veterinary Microbiology**. v.112, n. 2-4, p.141-150, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.032>

QUEIROZ, M. R.; GROFF, A. C. M.; SILVA, N. S.; GRISI FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S.; ONÇALVES, V. S. P. FERREIRA, F. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3639-3646, 2016.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos,**

caprinos e equinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.940-951, 2002.

RAJÃO, D.S. **Efeito da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 26p. 2008.

RAJÃO, D.S.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Leucose enzoótica bovina. **Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia**. n.64, p.60-72, 2012.

REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, p.583-586, 2000.

REIS D.O., ALMEIDA L.; FARIA A.R. Estudo comparativo entre linfossarcoma, tuberculose e linfadenites inespecíficas ocorridas em bovinos abatidos e a confirmação histológica. **Higiene Alimentar**, v.35, p.28-30, 1995.

REVIRIEGO, GORDEJO, F. J.; VERMEERSCH, J.P. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. **Veterinary Microbiology**. v.112, p.101–109, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.034>

RIBEIRO, L. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FRANCISCO, P. F. C.; MOTA, A. L. A. A.; NASCIMENTO, G. T.; LICURGO, J. B.; FERREIRA, F.; GRISI FILHO, J. H. H.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; BORGES, J. R. J. Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Distrito Federal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3561-3566, 2016.

RISTOW, P.; MARASSI, C.D.; RODRIGUES, A.B.; OELEMANN, W.M.; ROCHA, F.; SANTOS, A.S.; CARVALHO, E.C.; CARVALHO, C.B.; FERREIRA, R.; FONSECA, L.S.; LILENBAUM, W. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil, **The Veterinary Journal**, v.174, p.432–434, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.07.022>

RIVERA, F.E.B. **Levantamento sorológico utilizando-se a técnica de ELISA em rebanhos apresentando problemas reprodutivos**. I. Enterite paratuberculose, Anais do I Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul, p.20–22, 1996.

RIVERA, S.P.; GIMÉNEZ, J. F. La tuberculosis bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 11, n. 9, p. 1695-7504, 2010.

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

ROCHA, W. V.; JAYME, V. S.; GONÇALVES, V. S. P.; BRITO, W. M. E. D.; PIRES, G. R. C.; MOTA, A. L. A.; A.; GRISI FILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEUZUTKO, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNANDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v. 18, p. 306-319, 2007.

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrech, v. 13, n. 2, p. 107-111, 1981.

RORING, S.; HUGHES, M. S.; SKUCE, R. A.; NEILL, S. D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 227-236, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00189-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00189-9)

ROXO, E. M. bovis como causa de zoonose. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.18, n.1, p. 101-108, 1997.

ROUSSEL, A. J.; FOSGATE, G. T.; MANNING, E. J. B.; COLLINS, M. T. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.230, p.890-895, 2007. <https://doi.org/10.2460/javma.230.6.890>

RUGGIERO, A. P. M. **Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico da tuberculose bovina**. 68 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SÁ, L. M.; OLIVEIRA, J. M. B.; SANTOS, G. R.; BRANDESPIM, D. F.; SILVA-JÚNIOR, J. L.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da microrregião de Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.310-313, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000300006>

SALEM, M.; NATUR, S.; AMR A.EL-SAYED, A. A.; HASSAN, A.; BALJER, G.; ZSCHÖCK, M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: an insidious problem for the ruminant industry. **Tropical Animal Health and**

Production, v. 45, n.2, p.351-366, 2013.
<https://doi.org/10.1007/s11250-012-0274-2>

SANTOS, H. P. **Leucose Enzoótica Bovina: Estudo Epidemiológico na Bacia Leiteira do Estado do Maranhão e aperfeiçoamento do diagnóstico**. Tese em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 87p, 2010.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H. M.; PALMER, M. V.; HARRIS, B. N.; ORLOSKI, K. A.; BUDDLE, B. M.; THACKER, T. C.; LYASHCHENKO, K. P.; WATERS, W. R. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. **Transboundary and Emerging Diseases**. v.57, p. 205–220, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01148.x>

SCOTT, H. M.; SORENSEN, O.; WU, J. T.; CHOW, E. Y.; MANNINEN, K.; VANLEEUEWEN, J. A. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhoea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, n. 10, p. 981-991, 2006.

SCOTT, M. C.; BANNANTINE, J. P.; KANEKO, Y.; BRANSCUM, A. J.; WHITLOCK, R. H.; MORI, Y.; SPEER, C. A.; EDA S. Absorbed EVELISA: A diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle. **Foodborn Pathogens and Disease**. v.7, n.11, p.1291-1296, 2010.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0541>

SEVA, J.; SANES, J. M.; RAMIS, G.; MAS, A.; QUEREDA, J. J.; VILLARREAL-RAMOS, B.; VILLAR, D.; PALLARES, F. J. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**. v.171, p.139-146, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.035>

SEVIK, M.; AVCI, O.; İNCE, Ö. B. An 8-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity. **Tropical animal health and production**. v.47, n.4, p. 715-720, 2015.
<https://doi.org/10.1007/s11250-015-0783-x>

SILVA E.B. **Diagnóstico da paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Pará, Belém, 65p. 2005.

SILVA, M. C. P.; GONÇALVES, V. S. P.; MOTA, A. L. A. A.; KOLODA, M.;

FERREIRA NETO, J. S.; GRISI FILHO, J. H. H; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E. O.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; ALFIERI, A. A.; MULLER, E. E. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the Paraná State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3611-3624, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3611>

SILVA, R. C.; FONTANA, I.; MEIRELLES, F. C.; RUGGIERO, A. P. M.; BENATO, N.; BORGES, J. R. J. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na forma de linfossarcomas no distrito federal: relato de caso. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.4, p.507-512, 2008.

SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; MCDOWELL, S. W. J. Herd level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinary Medicine International**. v. 2012, 2012.

SLEDGE, D. G.; MAES, R.; WISE, A.; KIUPEL, M.; FITZGERALD, S. D. Coinfection of a cow with bovine leukemia virus and *Mycobacterium bovis*. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**, v. 21, p. 878-882, 2009. <https://doi.org/10.1177/104063870902100621>

STABEL J.R. **Immunology of Paratuberculosis. Infection and Disease**. In: Berhs M.A. & Collins D.M. (Eds), Paratuberculosis: Organism, disease, control. CABl.org, Cambridge. 375p. 2010. <https://doi.org/10.1079/9781845936136.0230>

STARLING, R. Z. C.; BEZERRE, A. O.; SALARDANE, I.; FERREIRA, P. G.; CLIPES, R. C.; DONATELI, D. N. Soroepidemiologia da leucose enzoótica bovina em propriedades leiteiras do município de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, Rio de Janeiro, v.6, n.12, p.427-441, 2013.

STRAIN, S. A. J.; MCNAIR, J.; MCDOWELL, S. W. J. Bovine tuberculosis: A review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle. **Agri-food and Biociences Institute**, 2011.

SUN, W. W.; LV, W.F; CONG, W.; MENG, Q. F; WANG, C.F; SHAN, X. F.; QIAN, A. D. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Bovine Leukemia Virus Seroprevalence and Associated Risk Factors in Commercial Dairy and Beef Cattle in Northern and Northeastern China. **Biomed Research International**, v.2015, p.1-7, 2015.

SWEENEY, R. W.; COLLINS, M. T.; KOETS, A. P. MCGUIRK, S. M.; ROUSSEL, A. J. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.26, p.1239-50, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.01019.x>

SZTEYN, J.; WISZNIEWSKA-LASZCZYCH, A. Seroprevalence of bovine

paratuberculosis infections in Poland. **Medycyna weterynaryjna**. 67(9):622-625, 2011.

TAYLOR, A.W. Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.63, p.333-336, 1957.
<https://doi.org/10.1002/path.1700630217>

THOEN, O.C.; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans 2^a ed, 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470344538>

TIMMS, V. J.; GEHRINGER, M. M.; MITCHELL, H. M.; DASKALOPOULOS, G.; NEILAN, B. A. Review. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection? **Journal of Microbiology Methods**, v.85, p.1-8, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.026>

TORRES-GONZALEZ, P.; SOBERANIS-RAMOS, O.; MARTINEZ-GAMBOA, A.; CHAVEZ-MAZARI, B.; BARRIOS-HERRERA, M. T.; TORRES-ROJAS, M.; CRUZ-HERVERT, L. P.; GARCIA-GARCIA, L.; SINGH, M.; GONZALEZ-AGUIRRE, A.; LEON-GARDUÑO, A. P.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; BOBADILLA-DEL-VALLE, M. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002177>

TRONO, K.G.; PEREZ-FILGUIERA, D.M.; DUFFY, S.; BORCA, M.V.; CARRILLO, C. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. **Veterinary Microbiology**. v.83, p. 235–248, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00420-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00420-5)

TURENNE, C. Y.; COLLINS, D. M.; ALEXANDER, D. C.; BEHR, M. A. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. **Journal of Bacteriology**. v. 190, n. 7, p. 2479-2487, 2008.
<https://doi.org/10.1128/JB.01691-07>

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, APHIS. **High prevalence of Bovine Leukosis Virus (BLV) in U.S.** Dairy herds. NAHMS Dairy Studies, Info Sheet, 2p. 1997.

USUI, T.; MEAS, S.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in dairy and beef cattle in Hokkaido. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.2, p. 287-289, 2003. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.287>

UYSAI, A.; YILMAZ, H.; BILAL, T.; BERRIATUA, E.; BAKIREL, U.; ARSLAN,

M.; ZERIN, M.; TAN, H. Seroprevalence of enzootic bovine leukosis in Trakya district (Marmara region) in Turkey. **Preventive Veterinary Medicine**, v.37, p.121-128, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00108-1)

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CAMELLI, M.; BOZZETTA, E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 20, p.164-169, 2008.

VELOSO, F. P.; BAUMGARTEM, K. D.; MOTA, A. L. A. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GRISI FILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; GONÇALVES, V. S. P. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3659-3672, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3659>

VENDRAME, F. B.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GRISI FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3639-3646, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3639>

VILAR, A. L.; SANTOS, C. S.; PIMENTA, C.L; FREITAS, T. D.; BRASIL, A. W.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; BEZERRA, C. S.; RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, T. S.; AZEVEDO, S. S. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.121, n.1-2, p.49-55, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.003>

WANG, Y. N.; CHI, C. Q.; CAI, M.; LOU, Z. Y.; TANG, Y. Q.; ZHI, X. Y.; LI, W. J.; WU, X. L.; DU, X. *Amycolicococcus subflavus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 638-643, 2010. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010546-0>

WATERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; VORDERMEIER, H.M.; GORMLEY, E.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; BANNANTINE, J.P.; SATBEL, J.R.; LINSKOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J.C. Development and evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.18, n.11, p.1882–1888, 2011. <https://doi.org/10.1128/CVI.05343-11>

WELLS, S.J.; WAGNER, B. A.; DARGATZ, D.A. Factors associated with *Mycobacterium paratuberculosis* Infection in U.S. Dairy Herds. In: **Proceedings of 6th International Colloquium on Paratuberculosis**. International Association for Paratuberculosis. Melbourne, Austrália, p. 62-65,

1999.

WELSH, M. D.; CUNNINGHAM, R. T.; CORBETT, D. M.; GIRVIN, R. M.; MCNAIR J.; SKUCE, R. A.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J. M. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis, **Immunology**. v.114, n.1, p.101-111, 2005.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02003.x>

WHITE, P.C.; BOHM, M.; MARION, G.; HUTCHINGS, M.R. Control of bovine tuberculosis in British livestock: there is no 'silver bullet'. **Trends in Microbiology**, v.16, n.9, p.420-427, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.06.005>

WHITLOCK, R. H. **Johne's disease**. In: Smith BP, editor. Large animal internal medicine. 4th edition. St Louis (MO): Elsevier; p. 881–7. 2009.

WHITTINGTON, R. J.; WINDSOR, P.A. In utero infection of cattle with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: a critical review and meta-analysis. **Veterinary Journal** v.179, n.1, p.60–9. 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>

WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I. B.; SAUNDERS, V.; GRANT, I. R.; JUSTE, R.; SEVILLA, I. A.; MANNING, E. J. B.; WHITLOCK, R. H. Culture phenotypes of genomically and geographically diverse Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolates from different hosts. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 5, p. 1822-1830, 2011.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00210-11>

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION SYSTEM (WAHIS) – version: 2. 2016. List of countries by disease situation.

YAMASAKI, E. M.; TOKARNIA, C. H.; GALVÃO, A.; GOMES, M. J. P.; CHIES, J. A. B.; VEIT, T. D.; ARAGÃO, A. P.; BRITO, M. F. Aspectos clínicos-patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, n.11, p.921-932, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100005>

YAMASAKI, E. M., BRITO, M. F.; MOTA, R. A.; MCINTOSH, D.; TOKARNIA, C. H. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.2, p.127-140, 2013.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000200001>

YAMAMOTO H. YOSHINO T, MATSUDA I, NAKAJIMA H. Histopathological definition of the adult and calf types of bovine leukosis. **National Institute of Animal Health**, v. 22, n. 3, p. 115-129, 1982.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIORAVANTI, R.L.; ROXO, E.; ZUMÁRRAGA, M.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism.

Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v. 96, p. 1-5, 2001.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000600012>

ZWICK, L.S.; WALSH, T. F.; BARBIERS, R.; COLLINS, M. T.; KINSEL, M. J.; MURNANE, R. D. Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.14, n.4, p.326-8, 2002.

<https://doi.org/10.1177/104063870201400409>

CAPÍTULO 2

ELISA indireto como método complementar de diagnóstico da tuberculose bovina

Artigo a ser submetido no periódico

Pesquisa Veterinária Brasileira

ELISA INDIRETO COMO MÉTODO COMPLEMENTAR DE DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA¹

Mariana A. Souza^{2*}, Nadia G. Bombonato², Cristina C. Dib³, Rinaldo Aparecido Mota⁴, Anna M. C. Lima⁵

ABSTRACT.-Souza M.A., Bombonato N.G., Dib C.C & Lima, A.M.C., 2017. **[Indirect ELISA as a complementary method of diagnosis of bovine tuberculosis.]** ELISA indireto como método complementar de diagnóstico da tuberculose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará, s/nº, Bloco D, sala33, Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil. E-mail: mari_assuncao@yahoo.com.br

Bovine tuberculosis is an economic and health problem in the world, requiring precise diagnostic methods for its control and eradication. The aim of this study was to evaluate the performance of a commercial ELISA test in the diagnosis of bovine tuberculosis. A total of 1644 cattle, from eight dairy herds, three of them with no recent history of the infection, and another five with positive results in the last tuberculin examination were evaluated by the comparative cervical tuberculin test (CCTT). For the serological diagnosis of tuberculosis, the commercial ELISA kit *Mycobacterium bovis* antibody test IDEXX® (ELISA *M. bovis*) was used. Serum samples from 846 cattle from the same eight herds selected for the study were evaluated in ELISA *M. bovis*. Positive animals in CCTT and/or ELISA *M. bovis* have been sent to slaughter. Positive in ELISA *M. bovis* was performed for macroscopic examination and classification of the carcasses in: presence or absence of lesions. Samples of lung, liver and lymph nodes (retropharyngeal, submandibular, cervical and mediastinal) were collected and stored under refrigeration for microbiological culture and subsequent confirmation by PCR. The same samples were also conditioned in bottles with 10% formaldehyde for the histopathological examination stained with Hematoxilina and Eosina (HE). Of the 1644 bovines 61 were considered positive and 65 inconclusive in CCTT. The retest of the inconclusives identified more 19 positives. In total, 80 (4.8%) CCTT positive cattle, from 5 herds were sent for slaughter. The ELISA *M. bovis* identified 4,2% (36/846) of positive cattle, 35 considered negative and one inconclusive in CCTT. Of the 36 positives in ELISA *M. bovis*, 27 were euthanized, and 11% (3/27) showed lesions suggestive of tuberculosis, in macroscopic examination, and two animals confirmed by histological, microbiological and PCR methods. The low association of ELISA *M. bovis* with the results obtained in macroscopic, histological and microbiological isolation, points to the fragility of the ELISA performance in field conditions.

INDEX TERMS: *Mycobacterium bovis*, serologic diagnosis, anergy, tuberculin test

RESUMO: A tuberculose bovina é um problema econômico e de saúde no mundo, que requer métodos de diagnóstico precisos para o controle e erradicação.

Objetivou-se com este estudo avaliar o desempenho de um teste comercial de ELISA no diagnóstico da tuberculose bovina. Foram avaliados pelo teste cervical comparativo (TCC) 1644 bovinos, provenientes de oito rebanhos de exploração leiteira, sendo três deles sem histórico recente da doença, e outros cinco com resultados positivos no último exame de tuberculinização. Para o diagnóstico sorológico da tuberculose utilizou-se o kit comercial de ELISA *Mycobacterium bovis* antibody test IDEXX® (ELISA *M. bovis*). Amostras de sorosanguíneo de 846 bovinos provenientes dos mesmos rebanhos foram também avaliadas no ELISA *M. bovis*. Os bovinos positivos no TCC e ELISA *M. bovis* foram encaminhados para o abate sanitário. Dos positivos no ELISA *M. bovis* foi realizado o exame macroscópico das carcaças e classificação das mesmas em: com presença ou ausência de lesões. Amostras de pulmão, fígado, linfonodos retrofaríngeo, submandibular, cervical e mediastínico, foram colhidas em duplicata para realização dos exames de cultivo microbiológico com posterior confirmação por PCR, e exame histopatológico com coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Dos 1644 bovinos 61 foram considerados positivos e 65 inconclusivos no TCC. O reteste dos inconclusivos identificou mais 19 positivos. No total, 80 (4,8%) bovinos positivos no TCC, provenientes de 5 rebanhos foram encaminhados para abate. O ELISA *M. bovis* identificou 4,2% (36/846) de bovinos positivos, sendo 36 considerados negativos e um inconclusivo no exame de tuberculinização. Dos positivos no ELISA *M. bovis*, 27 foram eutanasiados, e no exame macroscópico das carcaças 11% (3/27) dos animais apresentaram lesões sugestivas de tuberculose, e em apenas dois houve confirmação da doença pelos métodos histológico, microbiológico e PCR. A baixa associação dos resultados obtidos no ELISA *M. bovis* com os exames macroscópico, histológico e isolamento microbiológico apontam para a fragilidade do desempenho do ELISA em condições *in situ*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Mycobacterium bovis*, diagnóstico sorológico, anergia, tuberculinização

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (TB) é uma doença crônica, causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), um membro do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que compreende os agentes causais da tuberculose em diferentes espécies animais (Casal et al. 2014). Devido ao seu caráter zoonótico e às perdas econômicas provocadas na cadeia de carne e leite, a doença é motivo de controle e erradicação em programas de diversos países (Barbieri et al. 2016). A ferramenta básica utilizada no controle é a adoção de uma rotina de testes de diagnóstico, que têm por finalidade a identificação e eliminação dos animais doentes. Contudo, a qualidade dos testes utilizados para detecção de animais infectados por *M. bovis*, sempre foi um grande desafio para o controle da tuberculose (Álvarez et al. 2012; Bezos et al. 2014).

Desde a criação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), em 2001, avanços no controle da doença, caracterizados pela discreta redução das taxas de prevalência têm sido observados. Estudos realizados no período de 1989 a 1998 indicavam uma prevalência de aproximadamente 1,3% do rebanho nacional infectado (Pollock & Neill 2002). No estado de Minas Gerais, a prevalência estimada no ano de 1999 foi

de 5,04% em rebanhos e 0,81% em animais (Belchior et al. 2016). O último levantamento oficial realizado em 2013, a situação epidemiológica da TB no estado foi de 4,25% em rebanhos e 0,56% em animais (Barbieri et al. 2016). Apesar dos avanços, os exames hoje definidos pelo PNCEBT não apresentam resultados que garantam a total identificação da doença em rebanhos. Segundo Marassi et al. (2013), dentre os exames possíveis de serem utilizados no diagnóstico da tuberculose, nenhum deles é capaz de identificar todos os animais, em todos os estágios da infecção, sendo necessária a abordagem diagnóstica multivariada, a fim de aumentar a eficiência e confiabilidade na detecção dos animais infectados.

O exame de tuberculinização intradérmica, que utiliza derivados protéicos purificados (PPD), é o teste padrão mais utilizado no mundo para detecção de bovinos com tuberculose (Seva et al. 2014). O exame baseia-se na detecção de imunidade mediada por células, que predomina durante as fases iniciais e intermediárias da infecção, liderada principalmente por linfócitos Th1. (Casal et al. 2014). Conforme a doença progride, ocorre mudança da resposta Th1 por Th2, associada a diminuição da resposta imune celular e o desenvolvimento da resposta imune humoral (Welsh et al. 2005; McNair et al. 2007; Schiller et al. 2010). Alguns estudos têm apontado as fases pré-alérgica e avançada da tuberculose como causas de reações falso-negativas no exame de tuberculinização (Lilenbaum et al. 1999; Pollock & Neill, 2002). Assim, o exame sorológico constitui-se como alternativa para o rastreamento de bovinos infectados com *M. bovis*. A combinação de métodos baseados na resposta imune celular e ensaios sorológicos poderiam aumentar o nível de detecção do agente, contribuindo para o controle da doença (Schiller et al. 2010; Bezos et al. 2014).

Os testes ELISA para tuberculose têm demonstrado bons resultados como exame complementar para a identificação de rebanhos infectados com *M. bovis* (Schiller et al. 2010; Waters et al. 2011). Embora não seja considerado a primeira escolha diagnóstica, a vantagem dos testes ELISA é a capacidade de identificação de animais anérgicos (McNair et al. 2001), o que acontece em geral no estágio avançado da doença (Pollock & Neill, 2002; Welsh et al. 2005), porém, existem algumas limitações em relação à aplicabilidade como ferramenta de erradicação, dentre as quais se destacam o tipo de antígeno utilizado no teste, devido a semelhança do genoma de *M. bovis* com micobactérias não patogênicas (Garnier et al. 2003) e as fases da infecção nas quais não é possível detectar resposta sorológica (Welsh et al. 2005). Ao utilizar o exame de tuberculinização e sorológico simultaneamente, o animal será considerado positivo para tuberculose, quando for reagente em qualquer um ou ambos os exames e negativo quando não houver reação nos dois exames (Seva et al. 2014).

Apesar da eficiência do diagnóstico baseado na detecção da resposta imune celular a antígenos de *M. bovis*, o exame deve ser aplicado *in vivo*, o que torna difícil sua utilização em rebanhos com alta densidade e em estudos epidemiológicos, além do que, animais com infecção crônica podem não ser detectados nos testes intradérmicos. A possibilidade da utilização de testes sorológicos para tuberculose, tem sido sugerida como ferramenta complementar ao exame de tuberculinização. Diante disso, objetivou-se avaliar o desempenho do teste comercial ELISA *M. bovis* em rebanhos bovinos leiteiros naturalmente infectados para tuberculose.

MATERIAL E MÉTODOS

CEUA. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo nº 066/14.

Local. Um estudo transversal foi realizado em oito rebanhos de exploração leiteira localizados nos municípios de Guimarães (A), Lagoa Formosa (B), Patos de Minas (C e D), Perdizes (E), Prata (F), Serra do Salitre (G) e Uberlândia (H), situados na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, no estado de Minas Gerais, Brasil. Os rebanhos foram selecionados por conveniência, ou seja, naqueles que existiam (n=5) ou não (n=3) bovinos reagentes no último exame de tuberculinização. Os rebanhos eram constituídos de bovinos mestiços de várias raças, com idade entre 6 meses e 20 anos, e criados em sistema intensivo ou semi-intensivo e as vacas submetidas à ordenha mecânica e/ou manual.

Tuberculinização. Resultados do teste cervical comparativo (TCC), realizados como rotina por médicos veterinários oficialmente habilitados pelo PNCEBT, foram gentilmente cedidos para realização desta pesquisa. No total foram avaliados pelo TCC 1644 bovinos, e os resultados das diferenças ($\Delta B - \Delta A$) foram interpretados de acordo com o Regulamento Técnico do PNCEBT (Brasil, 2006). Os bovinos com resultado positivo no TCC foram eutanasiados e os inconclusivos retestados num prazo de 60 dias. Resultados inconclusivos em dois testes consecutivos foram considerados positivos.

ELISA *M. bovis*. Dos 1644 bovinos avaliados na tuberculinização, 846 provenientes de cada um dos oito rebanhos selecionados, foram também testados no ELISA *M. bovis*. A coleta das amostras de sangue foi realizada no mesmo dia da inoculação do PPD (bovino e aviário). De cada animal colheu-se 5mL de sangue por meio de punção da veia coccígea, o material foi transportado refrigerado ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e centrifugado a $3.000 \times g$ por 5 minutos. Em seguida, as amostras de soro foram acondicionadas em microtubos tipo *eppendorf* e congeladas a -20°C até a realização do exame.

Para o diagnóstico sorológico da TB utilizou-se o kit comercial de ELISA indireto *Mycobacterium bovis* Antibody Test – IDEXX®. O exame foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada a 450nm em espectrofotômetro de placas ThermoPlate, e o resultado avaliado pelo programa xCheck 3.3 IDEXX Laboratories. Para validação do exame utilizou-se como critérios: $CP\bar{x} \geq 0,300$ e $CN\bar{x} \leq 0,200$. A interpretação dos resultados foi determinada pela relação da absorbância (Amostra/Positivo). Relação $A/P = [(Amostra A(450) - CN\bar{x}) / (CP\bar{x} - CN\bar{x})]$. Amostras com relação $A/P \geq 0,30$ foram consideradas positivas para anticorpos contra *M. bovis*, e amostras com relação $A/P < 0,30$ foram consideradas negativas (Waters et al. 2011).

Diagnóstico anatomo-histopatológico. Os animais positivos no ELISA *M. bovis* foram eutanasiados e necropsiados. Carcaças e vísceras foram inspecionadas, e as lesões registradas e fotografadas. Na necropsia, os indivíduos foram classificados como “com presença” de lesão, quando em pelo menos um dos órgãos avaliados fosse verificada a presença de lesões sugestivas de tuberculose, ou lesão “ausente”.

Independente da presença de lesões macroscópicas, fragmentos de aproximadamente 1,5cm de pulmão, fígado, linfonodos retrofaríngeo, submandibular, cervical e mediastínico foram colhidos, armazenados em frasco

plástico esterilizado, e enviados ao Instituto Biológico de São Paulo para análise microbiológica. Em outros frascos contendo formol a 10% as mesmas amostras de tecido foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Animal da UFU para o exame histológico. Procedeu-se às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Foram feitos cortes de 4µm em micrótomo (LEICA 2125) e obtida uma lâminas histológica de cada bloco, a qual foi submetida à coloração de Hematoxilina-Eosina.

Isolamento microbiológico. O exame foi realizado no Laboratório de Tuberculose do Instituto Biológico de São Paulo-SP. Para descontaminação das amostras empregou-se o método clássico de Petroff (Kantor & Ritacco, 1988), e no isolamento das micobactérias utilizou-se o meio convencional a base de ovos, Stonebrink. Os tubos foram incubados em estufa à 37°C e a verificação de crescimento foi realizada semanalmente, até o aparecimento de colônias sugestivas de micobactérias ou contaminantes. A observação foi realizada até 90 dias pós-semeadura em incubação.

Identificação molecular das micobactérias. As colônias isoladas foram identificadas pelo método da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando-se os primers JB21 e JB22 descritos por Rodriguez et al. (1995) e modificado por Harakava et al. (2010). O produto amplificado foi analisado na sequência por eletroforese em cuba horizontal. Os géis de agarose a 1,5% contendo 0,01% de brometo de etídio foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com auxílio de fotodocumentador.

RESULTADOS

Tuberculinização

Dos oito rebanhos avaliados pelo TCC, em cinco (62,5%) detectou-se pelo menos um animal reagente. A prevalência de animais por rebanho variou de 0 a 29,2%. Dos 1644 bovinos avaliados 61 (3,7%) foram considerados positivos e 65 (4%) inconclusivos (Tabela 1). O reteste dos inconclusivos identificou mais 19 animais positivos, sendo, portanto, a prevalência em animais de 4,8% (80/1644). A oscilação das reações nos animais reagentes variou de 4,2 a 12,2mm ($\Delta B - \Delta A$). No total, 80 bovinos positivos foram encaminhados para o abate sanitário em matadouros frigoríficos da região.

De acordo com os resultados obtidos no TCC e informações sobre o histórico sanitário dos rebanhos, em três propriedades (A, D e F) não foram identificados bovinos positivos ou inconclusivos no teste intradérmico. Estas propriedades não tinham casos recentes de infecção, sendo inclusive uma delas (F) certificada pelo PNCEBT como livre para tuberculose e brucelose. As demais propriedades (B, C, E, G e H) tinham histórico recente da doença no rebanho, o que foi confirmado na última avaliação pela presença de animais positivos e inconclusivos no TCC.

ELISA *M. bovis*

Das 846 amostras de soro avaliadas, o ELISA *M. bovis* identificou 36 animais positivos, a razão amostra/positivo calculada para cada amostra variou de 0,333 a 2,637. Em todas as reações a densidade óptica média do controle positivo foi maior que 0,30 e negativo menor que 0,20.

Dos 36 bovinos positivos no ELISA *M. bovis*, apenas um animal foi também inconclusivo no TCC e os outros 35 apresentaram resultado negativo. Em dois rebanhos (A e B) todos os animais avaliados foram considerados negativos no ELISA *M. bovis* (Tabela 1). Dos 36 positivos no ELISA *M. bovis*, 27 foram eutanasiados.

Achados de necropsia dos bovinos positivos no ELISA *M. bovis*

De cada rebanho avaliado, naqueles onde se detectou bovinos reagentes no ELISA *M. bovis*, pelo menos um animal foi eutanasiado e necropsiado. No total 27 bovinos foram encaminhados para matadouros frigoríficos sob inspeção sanitária, ou eutanasiados na própria fazenda de origem. Na inspeção macroscópica das carcaças, observou-se que três animais (rebanhos C e E) apresentaram lesões sugestivas de tuberculose. Os achados anatomicopatológicos mais evidentes foram nódulos granulomatosos de aspecto purulento a caseoso no pulmão (Fig. 1), nos linfonodos mediastínicos e retrofaríngeos. Demais carcaças (24) foram classificadas como “lesão ausente”.

Diagnóstico histopatológico

No exame histopatológico, verificou-se que as amostras de pulmão e linfonodos mediastínicos provenientes de duas das três carcaças com lesões no exame macroscópico apresentaram alterações histológicas características de tuberculose. No linfonodo mediastínico do animal proveniente do rebanho (E) foi observado granuloma típico de tuberculose com áreas de necrose e calcificação circundadas por linfócitos, macrófagos e células gigantes de Langhans. No pulmão do animal procedente do rebanho (C) identificou-se reação granulomatosa caracterizada por necrose caseosa circundada por infiltrado predominantemente mononuclear e circundada por tecido conjuntivo fibroso (Fig. 2A), parênquima pulmonar com células gigantes de Langhans, com citoplasma amplo e núcleos dispostos na periferia das células (Fig. 2B).

Cultura e PCR

Das amostras de vísceras provenientes dos 27 bovinos positivos no ELISA *M. bovis*, apenas aquelas procedentes de dois animais foram positivas para *M. bovis* em meio Stonebrink e confirmadas por PCR com os *primers* JB21 e JB22. Tais amostras foram também classificadas como “com lesão” sugestiva de tuberculose na avaliação macroscópica e apresentaram alterações histológicas características do granuloma tuberculoso. Quanto aos resultados desses dois animais no TCC, um foi considerado positivo e outro inconclusivo.

DISCUSSÃO

A prevalência de 4,8% em animais e 62,5% em rebanhos, identificada neste estudo pelo TCC, demonstra que a infecção encontra-se presente na maioria dos rebanhos leiteiros avaliados. Em 2013, nas regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, importantes bacias leiteiras do país, foram observadas prevalências de 4,45%; 4,24% em rebanhos e 0,21%; 0,47% em animais respectivamente (Barbieri et al. 2016). Apesar da prevalência relativamente baixa de bovinos com tuberculose, nessas regiões, nota-se que a situação epidemiológica da doença permanece

praticamente estável. Países onde o programa de controle da tuberculose está há mais tempo, a prevalência da infecção é baixa, porém foram poucas as áreas que obtiveram a total erradicação da doença (Schiller et al. 2010). Um dos fatores possivelmente relacionados às dificuldades em se erradicar a tuberculose, está relacionada às limitações técnicas dos protocolos de diagnóstico (Schiller et al. 2010; Waters et al. 2011). De acordo com Vidal (2013), o uso continuado dos testes de tuberculinização intradérmica aplicados isoladamente parece ser insuficiente para erradicar a doença. Com a evolução dos programas de controle da TB e a redução da sua prevalência, a utilização de métodos complementares ao exame de tuberculinização intradérmica constituem um avanço importante para a identificação de focos e controle da doença (Schiller et al. 2010). Neste sentido, exames complementares como o sorológico, poderiam ser ferramentas adicionais para detectar animais que não reagem nos testes baseados na resposta imune celular, auxiliando dessa forma na identificação de bovinos em estágios avançados da doença, que produzem resultados falso-negativos na tuberculinização (Welsh et al. 2005; Waters et al. 2011).

Para avaliação do desempenho a campo do kit comercial ELISA *M. bovis* IDEXX, as amostras de soro utilizadas foram provenientes de rebanhos naturalmente infectados com tuberculose (B,C,E,G,H) e outros sem histórico da infecção, com resultados negativos nos exames de tuberculinização (A,D e F). Em dois rebanhos (C e E) um animal negativo e outro inconclusivo no TCC foram detectados pelo ELISA *M. bovis* e as amostras de vísceras (pulmão e linfonodo mediastínico) obtiveram isolamento e PCR positivo para tuberculose bovina. Nos rebanhos de origem (C e E), uma rotina de testes de tuberculinização já era adotada com frequência pelos proprietários, entretanto a utilização exclusiva do TCC não possibilitou o completo saneamento dos rebanhos. Esses dois bovinos positivos no ELISA *M. bovis* eram vacas, com idade de 5 e 8 anos, e no TCC apresentaram $\Delta B=0,8$; $\Delta A=0,5$ e $\Delta B=2,8$; $\Delta A=0,8$, respectivamente. O uso complementar do ELISA *M. bovis* nesses rebanhos, permitiu a detecção e eliminação de animais que se encontravam em anergia, ainda que não apresentassem tuberculose disseminada, sendo, portanto, fundamental para o bom desempenho do programa sanitário implantado nas propriedades. Possivelmente sem o uso dessa estratégia os animais permaneceriam nos rebanhos, se comportando como reservatórios do agente e disseminando a infecção para outros animais. Outros estudos também demonstraram a habilidade dos testes sorológicos em identificar animais negativos na tuberculinização, Lilenbaum & Fonseca (2006), observaram positividade no ELISA em dois bovinos negativos na tuberculinização, os quais foram posteriormente confirmados pelo isolamento microbiológico.

Dos 36 bovinos positivos no ELISA *M. bovis*, 35 foram negativos e um inconclusivo na tuberculinização. O TCC é amplamente usado para avaliar o desempenho dos testes ELISA de tuberculose bovina (Waters et al. 2011; Medeiros et al. 2010), porém a inversão observada entre as respostas celular e humoral, nas diversas fases da infecção (Ritacco et al. 1991; Welsh et al. 2005), limitam o TCC como balizador dos testes sorológicos (Vidal, 2013). Considerando a relação inversa entre a resposta imune mediada por células e humoral contra *M. bovis*, o teste intradérmico e os testes sorológicos buscam mensurar respostas imunológicas diferentes, que se desenvolvem em estágios distintos da infecção (Pollock et al. 2001). Nos bovinos os linfócitos T são as primeiras células

envolvidas na reação à tuberculose, com a evolução da doença ocorre o progresso da resposta imunológica celular para humoral. A resposta celular diminui e há um aumento da resposta humoral baseada em anticorpos IgG 1 (Welsh et al. 2005; Schiller et al. 2010). Contudo, a resposta humoral não parece ser capaz de controlar a infecção, a progressão da enfermidade e o aumento da carga bacteriana (Welsh et al. 2005).

A utilização do diagnóstico sorológico como ferramenta complementar ao exame de tuberculinização é bastante discutida, especialmente devido à variável sensibilidade (18-73%) (Wood et al. 1992; Casal et al. 2014). De acordo com Buddle et al. (2013), as variações na sensibilidade diagnóstica dos ensaios ELISA de tuberculose podem ser em decorrência do estágio de infecção ou ainda, pelas diferenças na virulência e antigenicidade das cepas de *M. bovis*. A resposta sorológica varia de acordo com o tipo de antígeno utilizado, alguns já foram descritos como potenciais alvos de diagnóstico (ESAT-6, CFP-10, MPB-70), embora a resposta seja principalmente desencadeada por MPB-83 (McNair et al. 2001; Waters, et al. 2011). Por outro lado, anticorpos contra ESAT-6 e MPB-70 foram detectados 12 semanas (Lyashchenko et al. 1998) e 20 meses (Fifis et al. 1992) após infecção experimental. O teste ELISA *M. bovis* Ab IDEXX utilizado neste estudo detecta anticorpos contra MPB-83 e MPB-70. A resposta desencadeada contra MPB-83 é a mais alta e isso sugere que esta proteína seja considerada um bom antígeno nos testes sorológicos (Bezoz et al. 2014; Waters et al. 2011).

A principal contribuição apontada pelos estudos com ELISA de tuberculose está no uso complementar aos exames intradérmicos, por meio da identificação de animais em anergia, ou seja, que apesar de infectados por *M. bovis* não demonstram aumento de volume no local de inoculação da tuberculina (Green et al. 2009; Koo et al. 2005; Waters et al. 2011; Whelan et al. 2010). Da mesma forma, buscou-se neste estudo a utilização estratégica do ELISA *M. bovis* junto ao TCC, na tentativa de identificar animais infectados não detectados pelo exame de tuberculinização. Assim, 36 bovinos de seis rebanhos (B,C,D,E,F,G) foram identificados no ELISA *M. bovis*. Apesar dos anticorpos anti MPB-83 serem mais precoces, diante os resultados obtidos na inspeção macroscópica das carcaças, cultura e PCR, esperava-se maior número de animais com lesões e isolamento/PCR positivo. Isto porque segundo Pollock et al. (2006), as lesões primárias da tuberculose aparecem geralmente de 7 a 11 dias após infecção e são pequenas, de cor amarelo pálido e com núcleo caseoso; conforme essas lesões progridem ocorre o desenvolvimento de necrose, mineralização e fibrose. Embora as recomendações de uso do ELISA tuberculose, sejam para detectar animais em estágios avançados da doença, nessas condições de campo, não foi possível a detecção de lesões patológicas em 24 dos 27 bovinos com sorologia positiva para TB. Diversos estudos relatam que a detecção de anticorpos anti *M. bovis* se dá em estágios avançados da doença ou em casos de tuberculose disseminada, sendo que em estágios iniciais a resposta humoral é baixa ou ausente, aumentando substancialmente com a evolução da doença (McNair et al. 2007; Neill et al. 1994; Pollock et al. 2001; Pollock & Neill 2002; Ritacco et al. 1991; Schiller et al. 2010; Welsh et al. 2005).

Dos oito rebanhos avaliados, três (A,D,F) apesar de não terem histórico da infecção ou animais positivos no último exame de tuberculinização, sendo um rebanho (F) inclusive certificado como livre para brucelose e tuberculose, foram detectados animais com anticorpos anti-*M. bovis*. Todas as propriedades

comercializavam leite e por isso eram frequentemente avaliadas por meio de uma rotina de exames recomendados pelo PNCEBT. Testes consecutivos de tuberculinização podem atuar como um *booster* para produção de anticorpos, aumentando assim a resposta humoral de bovinos infectados para tuberculose (Harboe et al. 1990). Souza et al., (2012), sugerem que a absorvância encontrada no ELISA em bovinos provenientes de rebanhos livres para tuberculose foi similar aos níveis encontrados em bovinos positivos no TCC, provavelmente devido às sucessivas tuberculinizações necessárias para aquisição do *status* de livre. Outra possibilidade para identificação de animais positivos no ELISA em rebanhos controlados é a sensibilização de animais negativos com micobactérias ambientais, ocasionando reações cruzadas entre os antígenos micobacterianos (Meneses et al. 2015). O genoma de *M. bovis* é constituído por aproximadamente 4 mil genes codificantes para proteínas e muitas delas são comuns a micobactérias não patogênicas (Garnier et al. 2003). Pode ser que a ausência de lesões de tuberculose e o isolamento microbiológico negativo para *M. bovis*, nos tecidos dos reagentes do ELISA, estejam relacionadas à possíveis reações cruzadas no exame com as micobactérias ambientais. Na tentativa de aperfeiçoar a acurácia do ELISA de tuberculose, pesquisadores do Brasil (Souza et al., 2012) desenvolveram o ELISA com o emprego das proteínas CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e uma quimera das proteínas recombinantes (ESAT-6/MPB70/MPB83). Segundo os autores o ELISA com a quimera ESAT-6/MPB70/MPB83 foi útil para discriminar entre bovinos positivos e negativos antes da aplicação do TCC e obteve sensibilidade de 83,2% e especificidade 86,5%.

Apenas três animais (11%) positivos no ELISA *M. bovis* apresentaram lesões sugestivas de tuberculose ao abate. O desempenho do ELISA IDEXX avaliado em rebanhos da Irlanda demonstrou que a sensibilidade aumenta quando na presença de lesões, variando de 90% em bovinos positivos no TCC e/ou Interferon gamma (IFN- γ) até 20% nos animais negativos em ambos os testes e sem lesões ao abate (Waters et al. 2011). Esses autores verificaram 63% de sensibilidade do exame (ELISA *M. bovis* IDEXX) em soro sanguíneo de bovinos reagentes aos testes de tuberculinização intradérmica e/ou histopatológico e/ou cultura. Já o estudo realizado por Souza et al. (2016) a sensibilidade do ELISA IDEXX foi de 2,5%, em bovinos positivos no teste de tuberculinização e com presença de lesões em 55% (22/40) das carcaças. De acordo com Seva et al. (2014), todos os animais reagentes isoladamente ou não, nos exames ELISA e tuberculinização são considerados positivos para tuberculose. Sendo assim, 80 bovinos positivos no TCC e 36 no ELISA *M. bovis* estariam infectados, porém o fato das amostras de vísceras de 25 dos 27 bovinos eutanasiados no ELISA *M. bovis* não terem apresentado lesões e resultado negativo no isolamento e PCR corroboram com a incerteza da infecção.

As variações observadas na sensibilidade diagnóstica dos ensaios ELISA de tuberculose é também influenciada pela prevalência da doença. A sensibilidade dos testes sorológicos parece ser mais baixa em países onde o controle da doença é bem sucedido, como Estados Unidos e Nova Zelândia, do que nos países com maior prevalência, como Irlanda e Grã-Bretanha (Waters et al. 2011; Buddle et al. 2013). A evolução da doença pode explicar a anergia de alguns bovinos infectados aos testes de hipersensibilidade tardia. A ausência da resposta celular nos animais infectados ocorre em particular quando a carga bacteriana é alta (McNair et al. 2001). Em bovinos infectados experimentalmente, verificou-se que a resposta

baseada na detecção de anticorpos é baixa ou ausente nos estágios iniciais e que a medida que a doença avança, a sensibilidade aumenta (Waters et al. 2011).

A escolha do teste e o ponto de corte utilizado para definir um animal como infectado é estabelecido pela relação inversa entre sensibilidade e especificidade dentro do contexto epidemiológico local. A alta sensibilidade aumenta a probabilidade de detectar animais infectados, mas em situações de menor prevalência, a alta especificidade é importante para reduzir o número de falso-positivos e, portanto, o abate desnecessário de animais (Nuñez-Garcia et al. 2017).

CONCLUSÃO

A baixa associação dos resultados obtidos no ELISA *M. bovis* com os exames macroscópico, histológico e isolamento microbiológico apontam para a fragilidade do desempenho do ELISA em condições *in situ*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS

- Alvarez J., Pérez A., Bezos J., Marqués S., Grau A., Saéz J.L., Mínguez O., De Juan L. & Domínguez L. 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet. Microbiol.* 155 (1):38-43.
- Ayres M., Ayres Júnior M., Ayres D. L. & Santos A. S. 2005. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Versão 4.0. Belém: Instituto de desenvolvimento sustentável Mamirauá.
- Barbieri J.M., Oliveira L.F., Dorneles E.M.S, Mota A.L.A.A., Gonçalves V.S.P., Maluf P.P., Ferreira Neto J.S., Ferreira F., Dias, R.A., Telles E.O., Grisi Filho J.H.H., Heinemann M.B., Amaku M. & Lage A.P. 2016. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil, 2013. 37 *Semin: Cien. Agrar.* (5):3531-3548.
- Belchior A.P.C., Lopes, L.B., Gonçalves, V.S.P. & Leite R.C. 2016. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 48(2):373-378.
- Bemer-Melchior P., Drugeon H.B. 1999. Inactivation of Mycobacterium tuberculosis for DNA Typing Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 37(7): 2350-2351.
- Bezoz J., Casal C., Romero B., Schroeder B., Hardegger R., Raeber A.J., López L., Rueda P. & Domínguez L. 2014. Current *ante-mortem* techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 97:44-52.
- Brasil. 2006. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da brucelose e tuberculose – PNCEBT. Brasil: MAPA/DAS/DAS, 2006. 184p.
- Buddle B.M., Wilson T., Luo D., Voges H., Linscott R., Martel E., Lawrence J.C. & Neill M.A. 2013. Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Bovine

- Tuberculosis from Milk Samples from Dairy Cows. *Clin. Vaccine Immunol.* 20:1812-16.
- Casal C., Díez-Guerrier A., Álvarez J., Rodríguez-Campo S., Mateos, A., Linscott R., Martel E., Lawrence J.C., Whelan C., Clarke J., O'Brien A., Domínguez L. & Aranaz A. 2014. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet. Microbiol.* 170:342-351.
- Fifis T., Corner L.A., Rothel J.S. & Wood P.R. 1994. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. *Scand. J. Immunol.* 39: 267-274.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V. & Hewinson R.G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(13):7877-82.
- Green L.R., Jones C.C., Sherwood A.L., Garkavi I.V., Cangelosi G.A., Thacker T.C Palmer M.V., Waters W.R. & Rathe, C.V., 2009. Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 16:1309-1313.
- Harakava R., Ikuno AA., Baldassi L., Roxo E. Identificação de *Mycobacterium bovis*: otimização da reação de PCR com os primers JB21 e JB22. Seminário Nacional sobre Brucelose e Tuberculose Animal, 2010, Belo Horizonte. Resumos dos trabalhos do Seminário Nacional sobre Brucelose e Tuberculose Animal. Belo Horizonte: BruTu/MAPA/UFMG, 2010.
- Harboe M., Wiker H.G., Duncan J.R., Garcia M.M., Dukes T.W., Brooks B.W., Turcotte C. & Nagai S. 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB-70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 28:913-21.
- Kantor I.N. & Ritacco V. 1988. Bacteriología de la tuberculosis humana y animal Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud. Serie de Monografías Científicas y Técnicas. (11):63p.
- Koo H.C., Park Y.H., Ahn J., Waters W.R., Palmer M.V., Hamilton M.J., Barrington G., Mosaad A.A., Park K.T., Jung W.K., Hwang I.Y., Cho S.N., Shin S.J. & Davis W.C 2005. Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison o the enzyme-linked immunosorbent, immunochromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *J Clin. Microbiol.* 43:4498-4506.
- Lilenbaum W., Ribeiro E.R., Souza G.N., Moreira E.C., Fonseca L.S., Ferreira M.A.S. & Schettini J. 1999. Evaluation of an ELISA-PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil", *Res. Vet. Sci.* 66(3):191-195.
- Lilenbaum W. & Fonseca, L.S. 2006. The use of ELISA as a complementary tool for bovine tuberculosis control in Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim.* 43(2):256-261.
- Lloyd, S. Effect of pregnancy and lactation upon infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 4, n. 1-2, p. 153-76, 1983.
- Lyashchenko K.P., Pollock J.M., Colangeli R. & Gennaro M.L. 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 66:5344-9.
- Marassi C.D., Medeiros L., Figueiredo E., Fonseca L.S., ; Duarte R., Paschoalin V., Oelemann W.M.R. & Lilenbaum W. 2013. A Multidisciplinary Approach to Diagnose Naturally Occurring Bovine Tuberculosis in Brazil, *Pesq. Vet. Bras.* 33(1):15-20.
- McNair J., Corbett D.M., Girvin R.M., Mackie D.P. & Pollock, J.M., 2001. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis. MPB83 is an early target with diagnostic potential. *Scandinavian Journal of Immunology* 53, 365-371.
- McNair J., Welsh M.D. & Pollock J.M. 2007. The immunology of bovine tuberculosis and

- progression toward improved disease control strategies. *Vaccine* 25:5504–5511.
- Medeiros L., Marassi C.D., Figueiredo E.E.S. & Lilenbaum W. 2010. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 41(3):531–541.
- Meneses I.I.F.S, Melo E.S.P., Ramos C.A.N., Osório A.L.A.R, Jorge K.S.G., Vidal C.E.S., Silva M.R., Pellegrin A.O.; Araújo F.R. 2015. Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* por ELISA. *Boletim de Pesquisa e desenvolvimento.*
- Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D.B. & Hanna J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Bovine Tuberculosis. Vet. Microbiol.* 40: 41–52.
- Núñez-García J., Downs S.H., Parry J.E., Abernethy D.A., Broughan J.M., Cameron A.R., Cook A.J., de la Rua-Domenech R., Goodchild A.V., Gunn J., More S.J., Rhodes S., Rolfe S., Sharp M., Upton P.A., Vordermeier H.M., Watson E., Welsh M., Whelan A.O., Woolliams J.A., Clifton-Hadley R.S. & Greiner M.. 2017. Meta-analyses of the sensitivity and specificity of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis in the UK and Ireland. *Prev. Vet. Med.* 0167-5877(16)30296-3.
- Pollock J.M., McNair J., Welsh M.D., Girvin R.M., Kennedy H.E., Mackie D.P. & Neill S.D. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81:103–107.
- Pollock J.M. & Neill, S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 163:115–127.
- Pollock J.M., Rodgers J.D., Welsh M.D. & McNair J., 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis. The role of experimental models of infection. *Vet. Microbiol.* 112 (2-4):141-150.
- Ritacco V., López B., De Kantor I.N., Barrera L., Errico F. & Nader A. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*, 50:365-7.
- Rodriguez J.G., Mejia, G.I., Del Portillo P., Patarroyo M.E., Murillo L.A. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiol.* 141:2131-2138.
- Schiller I., Oesch B., Vordermeier H.M., Palmer M.V., Harris B.N., Orloski K.A., Buddle B.M., Thacker T.C., Lyashchenko K.P. & Waters W.R. 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.* 57:205–220.
- Seva J., Sanes J.M., Ramis G., Mas A., Quereda J.J., Villareal-Ramos B., Villar D. & Pallares F.J. 2014. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 171:139-146.
- Souza I.I., Melo E.S., Ramos C.A., Farias T.A., Osorio A.L., Jorge K.S., Vidal C.E., Silva A.S., Silva M.R., Pellegrin A.O. & Araujo F.R., 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springerplus* 1: 77.
- Souza M.A., Bombonato N.G., Soares P.M., Ramos G.B., Castro I.P., Medeiros A.A. & Lima A.M.C. 2016. Exames complementares no diagnóstico da tuberculose em bovinos reagentes à tuberculinização comparada. *Arq. Inst. Biol.* 83:1-8
- Vidal C.E.S. 2013. Teste diagnósticos para detecção de bovinos infectados por *Mycobacterium bovis*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, RS. 89p.
- Waters W.R., Buddle, B.M., Vordermeier H.M., Gormley E., Palmer M.V., Thacker T.C., Bannantine J.P., Satbel J.R., Linscott R., Martel E., Milian F., Foshaug W. & Lawrence J.C. 2011. Development and evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine

- tuberculosis in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 18 (11):1882–1888.
- Welsh M.D., Cunningham R.T., Corbett D.M., Girvin R.M., McNair J., Skuce R.A., Bryson D.G. & Pollock J.M. 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology.* 114 (1):101-111.
- Whelan C., Whelan A.O., Shuralev E., Kwok H.F., Hewinson G., Clarke J. & Vordermeier, H.M., 2010. Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. *Clin. Vaccine Immunol.* 17:813–817.
- Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., Ripper J.L., Fifis T., McCormick B.S., Francis B., Melville L., Small K. & de Witte K. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 31:71–79.

Legendas das Tabelas e Quadros

Tabela 1. Resultados dos exames de tuberculinização (TCC), ELISA *M. bovis*, Inspeção Macroscópica, Histopatológico (HE) e Isolamento de *M. bovis* (Cultura e PCR) realizados a partir de amostras de bovinos provenientes de propriedades de exploração leiteira da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba - MG, Brasil, 2017.

Lista de Figuras

Figura 1. Pulmão observado durante a necropsia, com granuloma contendo massa caseosa, de consistência pastosa e amarela, identificada em um bovino (rebanho C) positivo no ELISA *M.bovis*, Minas Gerais, Brasil, 2017.

Figura 2. Fotomicrografia de pulmão identificada em bovino (rebanho C) positivo no ELISA *M.bovis*, Minas Gerais, Brasil, 2017. **A.** Reação granulomatosa caracterizada por necrose caseosa central e circundada por tecido conjuntivo fibroso HE. 10x **B.** Parênquima pulmonar com células inflamatórias mononucleares e células gigante tipo Langhans. Citoplasma amplo e núcleos dispostos na periferia da célula. HE. 40x.

Tabela 1.

Rebanho	Bovinos testados TCC (N)	Positivos TCC	Inconclusivo TCC	Reteste dos Inconclusivos	Prevalência TCC (%)	Bovinos testados ELISA <i>M. bovis</i> (n)	Positivos ELISA <i>M. bovis</i>	Eutanasiados ELISA <i>M. bovis</i>	Lesões inspeção macroscópica	Histopatológico HE	<i>M. bovis</i>	
											Cultura	PCR
A	99	0	0	0	0	40	0	0	NR	NR	NR	NR
B	50	1	1	1	4,0	50	0	0	NR	NR	NR	NR
C	92	2	6	1	3,2	92	3	3	2	1	1	1
D	155	0	0	0	0	50	2	1	0	0	0	0
E	164	41	29	7	29,2	92	6	2	1	1	1	1
F	660	0	0	0	0	148	5	2	0	0	0	0
G	90	8	12	3	13,3	40	3	2	0	0	0	0
H	334	9	17	7	4,8	334	17	17	0	0	0	0
TOTAL	1644	61	65	19	4,8%	846	36	27	3	2	2	2

N: Total de bovinos avaliados no TCC

n: Total de bovinos avaliados no ELISA *M. bovis*

NR: exame não realizado

Figura 1.

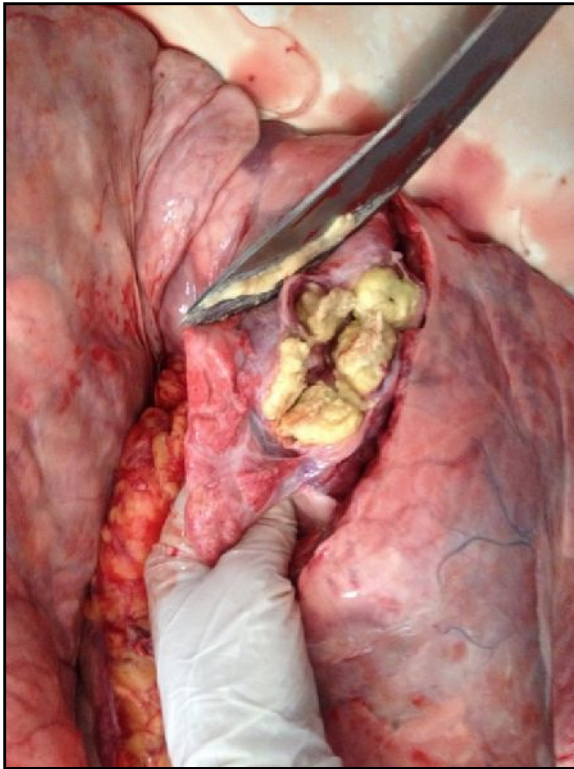
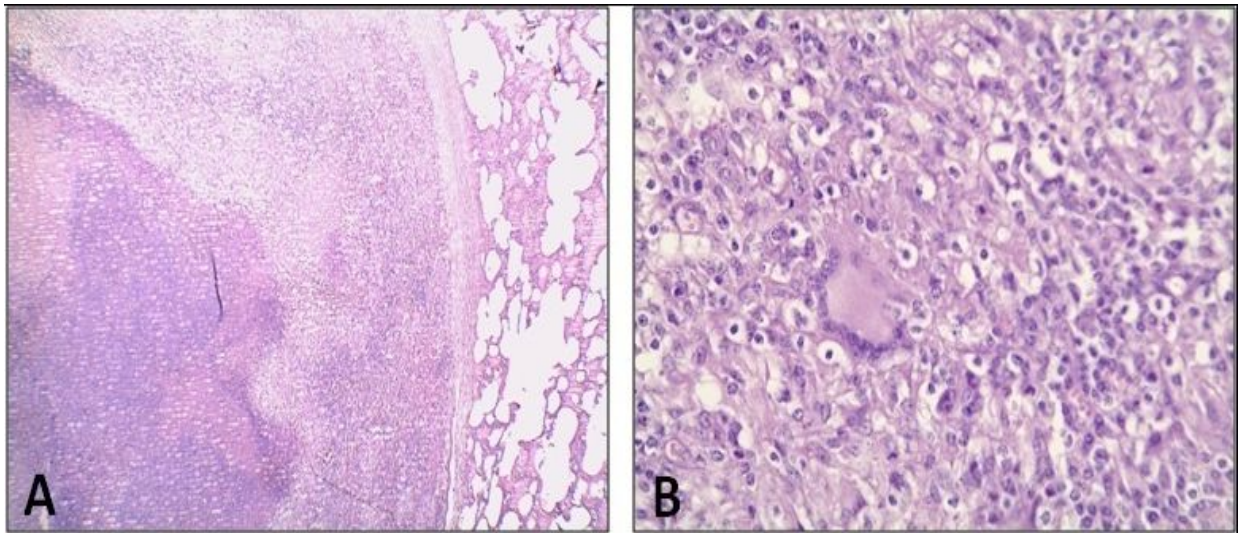


Figura 2.



CAPÍTULO 3

Intercorrência da paratuberculose em bovinos reagentes na tuberculinização

Artigo submetido no periódico

Pesquisa Veterinária Brasileira

INTERCORRÊNCIA DA PARATUBERCULOSE EM BOVINOS REAGENTES NA TUBERCULINIZAÇÃO¹

Mariana A. Souza^{2*}, Anna M.C. Lima³, Nicole P. Soares², Alessandra A. Medeiros-Ronchi⁴, Pedro P.F. Albuquerque⁵, Rinaldo A. Mota⁶, Leandro C. Rezende⁷ e Antônio A. Fonseca-Júnior⁷

ABSTRACT.- Souza M.A., Lima, A.M.C., Soares N.P., Medeiros-Ronchi A.A., Albuquerque P.P.F., Mota R.A., Rezende L.C., Hodon M.A. & Fonseca-Júnior A.A. 2016. [Intercurrence between paratuberculosis in cattle reagents to intradermal tuberculin test.] Intercorrência da paratuberculose em bovinos reagentes na tuberculinização comparada. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará, s/nº, Bloco D, sala33, Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil. E-mail: mari_assuncao@yahoo.com.br

The intradermal tuberculin test is the main test used for screening of bovine tuberculosis (TB), however false positive reactions may occur in the presence of other non-tuberculous mycobacterias (NTM). The purpose of this study was to perform the differential diagnosis for paratuberculosis (PTB), in cattle positive to comparative cervical tuberculin (CCT). A herd of 334 animals were evaluated in CCT, ELISA TB IDEXX®, and ELISA PTB IDEXX®. All animals reagents in CCT were euthanized and necropsied. Fragments of lymph nodes, lungs and intestines were collected and analyzed for histopathology methods, as hematoxylin-eosin staining (HE). Lung samples and lymph nodes (retropharyngeal, submandibular, cervical and mediastinal) from animals positives to CCT were evaluated for qPCR of *M. bovis*, and intestines and mesenteric lymph nodes in the PCR of PTB. The CCT identified sixteen animals reagents. Any macro or microscopic lesions were identified as suggestive for TB, and also was not detected the DNA of *M. bovis* in qPCR. However in nine animals (9/16), the DNA of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) were identified, and in twelve carcasses (12/16) characteristics of PTB lesions were viewed and confirmed by histopathology methods. Antibodies anti-MAP was detected in nine animals, and seventeen for *M. bovis*. No animal positive in ELISA TB or PTB were reacted in CCT. The infection for MAP may caused inespecific reactions in tuberculin. Despite limitations related to the specificity of intradermal test, in the epidemiological viewpoint, the exam is the best available test for the sanitation herds with TB.

INDEX TERMS: Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, cattle, serology.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Pós-Graduação em Ciências Veterinárias Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Rua Ceará, s/n. Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil.

³ Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, FAMEV-UFU. Rua Ceará, s/n. Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil.

⁴ Laboratório de Patologia Animal, FAMEV-UFU. Rua Ceará, s/n. Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil.

⁵ Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n. Dois Irmãos, Recife PE 52171-900 Brasil.

⁶ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n. Dois Irmãos, Recife PE 52171-900 Brasil.

⁷ Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Pedro Leopoldo, MG. Avenida Rômulo Joviano, s/n, Centro, Pedro Leopoldo, MG 33600-000 Brasil.

RESUMO.- O exame de tuberculinização intradérmica é o teste mais utilizado no mundo para detecção de bovinos com tuberculose (TB), porém reações falso-positivas podem ocorrer na presença de outras micobactérias não tuberculosas (MNT). Objetivou-se com este estudo pesquisar a intercorrência da paratuberculose em bovinos reagentes no teste cervical comparativo de diagnóstico de tuberculose. Para isto, 334 bovinos foram avaliados pelo teste cervical comparativo (TCC), ELISA de TB IDEXX® e ELISA PTB IDEXX®. Todos os animais positivos no TCC foram eutanasiados e necropsiados. Fragmentos de linfonodos, pulmões e intestinos foram colhidos e analisados por métodos histopatológicos, com coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). Amostras de pulmão e linfonodos (retrofaríngeo, submandibular, cervical e mediastínico) dos animais positivos no TCC foram avaliadas pela qPCR de *M. bovis*, e intestinos e linfonodos mesentéricos na PCR de PTB. Dezesseis bovinos foram reagentes no TCC. Nesses, não foram identificadas lesões macro ou microscópicas sugestivas de TB e também não foi detectado a presença de *M. bovis* na qPCR. Entretanto, nas amostras de nove animais (9/16), identificou-se o DNA de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e em doze carcaças (12/16) foram visualizadas lesões características de PTB, as quais foram confirmadas pelos métodos histopatológicos. Em outros nove animais do rebanho detectou-se anticorpos anti-MAP e em dezessete anti-*M. bovis*. Nenhum dos positivos no ELISA TB ou PTB reagiram no TCC. A infecção por MAP pode ter causado reações inespecíficas na tuberculinização. Apesar das limitações relacionadas à especificidade do teste intradérmico, do ponto de vista epidemiológico, o exame é o melhor teste disponível para o saneamento de rebanhos com tuberculose.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Tuberculose, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, bovino, sorologia.

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (TB) é uma doença de importância econômica e zoonótica, causada por agentes bacterianos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), cuja principal espécie causadora é *M. bovis* (Corner et al. 2012), porém outras espécies podem estar envolvidas, como *M. caprae* (Prodinger et al. 2005), *M. africanum* (Rahim et al. 2007) e *M. tuberculosis* (Berg et al. 2009; Thakur et al. 2012). Além do CMT, o gênero *Mycobacterium* compreende o complexo *Mycobacterium avium-intreccellulare* (MAC), formado por cepas não tuberculosas as quais fazem parte *M. avium* subsp. *avium*; *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; *M. avium* subsp. *silvaticum*; *M. avium* subsp. *hominissuis* e *M. intracellulare* (Biet et al. 2005). As micobactérias do complexo MAC não são virulentas para bovinos, com exceção de *M. avium paratuberculosis* (MAP), que provoca enterite infecciosa de natureza granulomatosa incurável, caracterizada por diarreia crônica e intermitente, emagrecimento, queda na produção e aumento da susceptibilidade a outras infecções (Yamasaki et al. 2010).

Os programas de controle da TB são baseados no método de diagnóstico padrão, que é o teste intradérmico com derivados protéicos purificados (PPD), utilizados para identificação e eliminação de animais doentes (OIE, 2013). A qualidade dos testes de diagnóstico para detecção de animais infectados com *M. bovis* sempre foi um grande desafio para o controle da TB. Atualmente nenhuma das opções de exames disponíveis permite a discriminação completa entre animais com e sem infecção (Seva et al. 2014). As principais limitações dos testes disponíveis estão relacionadas à sensibilidade e especificidade diagnóstica, que resultam em reações falso-positivas devido à existência de infecções cruzadas, e ainda reações falso-negativas, inerentes ao estado de anergia de alguns animais (Álvarez et al. 2012). Este cenário dificulta a tomada de decisão para a aplicação de medidas sanitárias e em parte afetam o avanço dos programas de erradicação que têm por objetivo o controle e erradicação da doença (Bezoz et al. 2014).

O exame de tuberculinização intradérmica é o teste padrão mais utilizado no mundo para detecção de bovinos com tuberculose (Seva et al. 2014). O teste cervical comparativo (TCC), o qual utiliza PPD bovino e aviário ganha em especificidade sobre o teste cervical simples (TCS), superando um dos problemas associados, como as reações inespecíficas com micobactérias não tuberculosas (MNT), e em sensibilidade quando comparado ao teste da prega caudal (TPC), uma vez que a região cervical parece ser de duas a três vezes mais sensível que a região da cauda (Monaghan et al. 1994). Uma das principais limitações do diagnóstico *in vivo* e *in vitro* da tuberculose, tem sido a reatividade cruzada, com respostas induzidas por outras MNT, com destaque para o MAP, considerado a principal causa de reações falso-positivas no exame intradérmico (Aranaz et al. 2006), e cuja ocorrência tem sido descrita em diversas regiões do Brasil, Pará (Silva, 2005), Pernambuco (Mota et al. 2007), Rio de Janeiro (Yamasaki et al. 2010), Minas Gerais (Carvalho et al. 2012), Paraíba (Medeiros et al. 2012) e Rio Grande do Sul (Fiss et al. 2015).

Na tentativa de aumentar a sensibilidade diagnóstica, exames complementares como interferon gama (IFN- γ) (Wood & Jones, 2001) e enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Waters et al. 2011) são recomendados. Ao utilizar estes exames simultaneamente, o animal será considerado positivo para tuberculose, com resultado positivo em qualquer um ou ambos os exames, e negativo, com resultado negativo nos dois exames (Seva et al. 2014). Nesse mesmo sentido, os ensaios de reação em cadeia pela polimerase (PCR) possibilitaram boa melhoria na sensibilidade diagnóstica e que ainda é aumentada se utilizada a PCR em tempo real (qPCR), por garantir a melhor precisão, reprodutibilidade e controle de qualidade do processo, reduzindo contaminações e por permitir a análise de um grande número de amostras em curto intervalo de tempo (Sales et al. 2014).

Para garantir o controle da TB, reduzindo a prevalência da doença, testes de diagnóstico sensíveis e mais específicos são necessários para o avanço na estratégia de controle em direção à erradicação. Além disso, mais estudos que demonstrem a correlação das alterações patológicas com os resultados dos testes de diagnóstico, em animais co-infectados com *M. bovis* e MAP em condições de campo são necessários. Diante disso, o objetivo deste estudo foi pesquisar a intercorrência da paratuberculose em bovinos reagentes no teste cervical comparativo de tuberculose.

MATERIAL E MÉTODOS

CEUA. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo nº 066/14.

Local e Animais. Propriedade de exploração leiteira localizada no Município de Uberlândia MG. Foram avaliados bovinos da raça Holandesa de ambos os sexos, com idade entre seis meses e 20 anos.

Histórico da propriedade. Desde o ano de 2005, houve registros de bovinos reagentes no exame de tuberculinização comparada, tendo sido identificados pelo menos 14 bovinos positivos.

Tuberculinização. Foram examinados 334 bovinos pelo TCC, de acordo com os critérios recomendados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Utilizou-se cutímetro Suprivet de pressão e seringas semi-automáticas multidoses McIntock. As tuberculinas PPD bovina e aviária foram adquiridas do laboratório TECPAR/PR, partida PPD bovino 001/12 e PPD aviário 003/12, fabricação Nov/2012. Os resultados das diferenças ($\Delta B - \Delta A$) foram interpretados de acordo com Regulamento Técnico do PNCEBT (Brasil, 2006). Os bovinos com resultado positivo no TCC foram encaminhados para eutanásia, e os inconclusivos retestados num prazo de 60 dias.

Patologia. Todos os bovinos positivos no TCC foram eutanasiados e necropsiados; carcaças e vísceras foram avaliadas macroscopicamente, e as lesões registradas e fotografadas. Durante a inspeção das carcaças, observou-se lesões sugestivas de paratuberculose, por isso foi realizado também o diagnóstico diferencial dessa doença.

Fragmentos de aproximadamente 1,5cm de pulmão, intestinos, linfonodos retrofaríngeo, submandibular, cervical, mediastínico e mesentérico foram colhidos e armazenados em frasco plástico esterilizado, contendo formol a 10%. O material foi identificado e encaminhado ao Laboratório de Patologia Animal da UFU. As amostras foram submetidas às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Foram feitos cortes de 4µm em micrótomo (LEICA 2125) e obtido duas lâminas histológicas de cada bloco, as quais foram submetidas à coloração de HE.

qPCR *M. bovis*. Amostras de pulmão, linfonodos retrofaríngeo, submandibular, cervical e mediastínico dos animais positivos no TCC, foram congeladas e encaminhadas ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura Agropecuária e Abastecimento (MAPA), em Pedro Leopoldo MG.

A extração do DNA foi realizada com o kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany) conforme recomendações do fabricante, sem modificações (Moura et al., 2016). As amostras de DNA extraído foram submetidas a PCR quantitativa (qPCR) no termociclador QuantStudio 7 Flex™ Real-Time PCR System (Life Technologies, USA). A reação de amplificação foi realizada com um volume final de 25µL, sendo 3µL de DNA (100ng), 4,0µL de água DEPC, 12,5µL de RealQ PCR 2 x Master Mix (Amplicon, Denmark), 4,0µL de MgCl₂ (25nM). Os primers e probes utilizados na qPCR tinham como alvo o gene que codifica a região de diferença 4 (RD4) e do elemento de inserção IS1081. A sequência RD4 foi amplificada e detectada por meio da utilização dos primers RD4 Mbo.RD4.88.F (CGCCTTCCTAACCAGAATTG) e Mbo.RD4.88.R (GGAGAGCGCGTTGTAGG) e a probe Mbo.RD4.88.S (5' FAM-AGCCGTAGTCGTGCAGAAGCGCA-BHQ1 3'). Para a

amplificação e detecção do elemento IS1081 os seguintes primers foram utilizados: M.bo.IS1081.124.F (AGGAACGCCTCAACCGAGAG) e M.bo.IS 1081.124.R (CCTTCGATCCATTCGTCTGTG), e a probe Mbo.IS1081.124.S (5' FAM-CGACGCC GAACCGACGTCGTC-BHQ1 3').

O esquema de ciclagem utilizado foi: 50°C por 2min, 95°C por 10min e 50 ciclos a 95°C por 15s e 60°C por 1min. As amostras consideradas positivas foram aquelas que amplificaram em um Cq menor ou igual a 42. Todas as amostras que amplificaram com Cq acima desse valor foram consideradas negativas. O controle positivo utilizado foi o DNA da estirpe de referência de *M. bovis* AN5.

ELISA TB. De todos os 334 bovinos avaliados no TCC, foram colhidos 5mL de sangue por meio de punção da veia coccígea, o material foi transportado refrigerado (2 a 8°C) ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da UFU, e centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos. Em seguida, as amostras de soro foram acondicionadas em microtubos tipo *ependorf* e congeladas a -20°C até a realização dos exames.

Para o diagnóstico sorológico da TB utilizou-se o kit comercial de ELISA *Mycobacterium bovis* Antibody Test – IDEXX®. O exame foi realizado no LADOC - FAMEV - UFU, de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada a 450nm em espectrofotômetro de placas ThermoPlate, e o resultado avaliado pelo programa xCheck 3.3 IDEXX Laboratories. Para validação do exame utilizou-se como critérios: $CP\bar{x} \geq 0,300$ e $CN\bar{x} \leq 0,200$. A interpretação dos resultados foi determinada pela relação da absorbância (Amostra/Positivo). Relação A/P = $[(\text{Amostra A}(450) - CN\bar{x}) / (CP\bar{x} - CN\bar{x})]$. Amostras com relação A/P igual ou maior que 0,30 foram consideradas positivas para anticorpos contra *M. bovis*, e amostras com relação A/P inferior a 0,30 foram consideradas negativas.

ELISA PTB. Para o diagnóstico sorológico da PTB utilizou-se o kit comercial de ELISA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Antibody Test – IDEXX®, todos as 334 amostras foram também avaliadas no exame.

O teste foi realizado no LANAGRO de Pedro Leopoldo – MG, de acordo com as instruções do fabricante. Os valores de densidade óptica (DO) das amostras e controles foram medidos em espectrofotômetro de placas a 450nm. Para validação do exame utilizou-se como critérios: $CP\bar{x} \geq 0,350$ e $CP\bar{x} / CN(DO\ 450) \geq 3,00$. O cálculo dos resultados foi determinado pela relação: $100 \times [(\text{Amostra A}(450) - CN(DO\ 450)) / (CP\bar{x} - CN(DO\ 450))]$. A interpretação dos resultados foi realizada considerando-se os seguintes parâmetros: amostras com relação A/P% $\leq 45\%$ Negativas; $45\% < A/P\% < 55\%$ Suspeitas e $A/P\% \geq 55\%$ Positivas.

PCR IS900. Amostras de intestino, válvula íleo cecal e linfonodos mesentéricos dos animais positivos no TCC, foram colhidas em frascos esterilizados, e armazenadas em ultrafreezer a -80°C. O material foi encaminhado congelado ao Laboratório de Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Para a extração do DNA, aproximadamente 0,03mg de cada amostra de tecido foi devidamente macerada e posteriormente utilizou-se o kit comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System para realização da extração do DNA de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi submetido às amplificações em um volume final de 15µL contendo: 5µL de DNA genômico; 0,5µL dos *primers* específicos para IS900 a 20pMol (DF: 5'-GACGACTCGACCGCTAATTG-3' e o DR-1: 5'-

CCGTAACCGTCATTGTCCAG-3'); 2,75µL de água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das reações foi realizado em um termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO. LTD) com desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, em seguida 35 ciclos a 95°C por 1 minuto cada, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos (Taddei et al. 2008). O produto amplificado de 99pb correspondente ao DNA do MAP foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com *bluegreen* e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados (Taddei et al. 2008). Como controle positivo utilizou-se o DNA de uma cepa de Map cedida gentilmente pelo LANAGRO Minas Gerais, identificada como "Nakajima 1991".

Estatística: Para verificar a independência entre os resultados, empregou-se o teste de qui-quadrado de McNemar. Para a comparação dos exames ELISA TB e TCC foi realizado o cálculo do Índice Kappa de concordância, com intervalo de confiança de 95%, no programa BioEstat (versão 4.0) (Ayres et al. 2005).

RESULTADOS

Tuberculinização

Dos 334 bovinos avaliados pelo teste cervical comparativo, 9 foram considerados positivos e 17 inconclusivos. Após 60 dias, o reteste dos inconclusivos identificou mais 7 bovinos positivos. A oscilação das reações nos animais reagentes variou de 0,5 a 4mm (ΔA); 4,3 a 8,8mm (ΔB) e 4 a 5,2mm ($\Delta B - \Delta A$). No total, 16 bovinos positivos no TCC foram encaminhados para eutanásia.

Achados de necropsia no TCC

Na inspeção macroscópica das carcaças não foram visualizadas lesões sugestivas de tuberculose, os achados anatomo-patológicos mais evidentes foram o espessamento da mucosa dos intestinos, encontrado em 12 dos 16 bovinos necropsiados. A superfície mostrava-se irregular, de aspecto avermelhado, semelhante à circunvoluções cerebrais, com dobras transversais bem evidentes (Fig. 1). O ceco também apresentava espessamento da mucosa e havia nodulações com aspecto polipóide. Em nove carcaças foram encontrados nódulos de vários tamanhos na serosa e mucosa intestinal, apresentando-se amarelos, algumas vezes com halo hiperêmico ao redor e com o centro branco acinzentado. Os linfonodos mesentéricos e ileoceais estavam aumentados de volume, com aspecto escuro na região medular. Em três animais identificou-se nódulos esbranquiçados na região cortical dos linfonodos, os quais apresentavam acúmulo de líquido de aspecto leitoso no seio medular (Fig. 2). Em cinco carcaças o baço estava aumentado de volume e pulposo. Ao corte observou-se folículos linfóides proeminentes; nos demais órgãos não foram observadas alterações macroscópicas.

Achados histopatológicos

Os principais achados histopatológicos foram observados no intestino delgado e linfonodos mesentéricos e identificados como enterite, linfangite, linfangiectasia e linfadenite granulomatosa. No intestino as alterações caracterizavam-se por vasos linfáticos dilatados e inflamados infiltrado inflamatório intenso na lâmina própria da mucosa e submucosa, (Fig. 3), composto por linfócitos, macrófagos epitelióides, plasmócitos e eosinófilos; hiperplasia de

glândulas caliciformes; hipertrofia da muscular. Nos linfonodos mesentéricos observou-se formações nodulares granulomatosas circundada por células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos); necrose caseosa e calcificação (Fig. 4). Destaca-se que a Fig. 4 corresponde ao aspecto microscópico da Fig. 2.

O aspecto microscópico dos nódulos presentes na submucosa do intestino, caracterizou-se por um centro necrótico, com infiltrado de células inflamatórias, constituído por linfócitos, macrófagos e eosinófilos, o que sugeriu o quadro de esofagostomose, tanto pelo aspecto macro quanto microscópico.

ELISA TB

Dentre as 334 amostras de soro avaliadas, o ELISA *M. bovis* Antibody Test (IDEXX®) identificou 17 animais positivos, com densidade óptica média variando de 0,333 a 2,637 e relação A/P superior a 0,30. A densidade óptica média do controle positivo foi maior que 0,30 e negativo menor que 0,20. Todos os bovinos positivos no ELISA *M. bovis* foram considerados negativos no TCC.

A concordância obtida na comparação dos testes ELISA TB e TCC foi de 90,1%, com coeficiente Kappa= -0,05, denotando fraca replicabilidade entre os exames. A diferença entre esses resultados não foi significativa pelo teste de McNemar, com $X^2 = 0.0$ ($p > 0,05$) (Tabela 1).

qPCR *M. bovis*

Das amostras de tecido (pulmão, linfonodos retrofaríngeo, submandibular, cervical e mediastínico) provenientes dos 16 bovinos positivos no TCC, não foi detectado o DNA de *M. bovis*.

ELISA PTB

Das 334 amostras de soro avaliadas, o ELISA *M. avium* subsp. *paratuberculosis* Antibody Test – IDEXX® detectou anticorpos anti-MAP em 9 animais, com valor de densidade óptica média maior que 0,777 e relação A/P superior a 0,70. A densidade óptica média do controle positivo foi maior que 0,70 e negativo menor que 0,60. Todos os bovinos positivos no ELISA PTB foram negativos no TCC para tuberculose. Nesses animais a reação no PPD aviário (ΔA) variou de 0,5 a 2,7mm.

PCR IS900

Das amostras de intestino e linfonodos mesentérico avaliadas na PCR, proveniente dos 16 bovinos reagentes no TCC, 9 amostras amplificaram a sequência genética IS900 específica de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, totalizando assim 9 animais positivos na PCR de PTB.

DISCUSSÃO

A frequência da TB determinada por meio do TCC foi de 4,8% no rebanho estudado. Na necropsia dos positivos, não foram identificadas lesões macroscópicas típicas da tuberculose nas carcaças, e o exame histopatológico das amostras de tecido também não detectou alterações características da doença. Situações em que bovinos positivos na tuberculinização não apresentam lesões podem ocorrer, tais condições podem estar associadas à infecções recentes, sensibilização com micobactérias não tuberculosas; infecção latente ou infecções

intercorrentes com bactérias pseudotuberculosas como *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Trylich, 1960). Outro exame complementar ao diagnóstico intradérmico e utilizado neste estudo, foi a qPCR. Neste, também não foi identificada a presença do DNA de *M. bovis*, em nenhuma amostra proveniente dos bovinos positivos no TCC. Apesar de ser considerado um método muito sensível para detecção de agentes infecciosos, o exame é influenciado pelo tipo de extração (Moura et al. 2016), de acordo com esses autores, o kit de extração que proporciona melhor sensibilidade analítica na qPCR de *M. bovis* é o DNeasy Blood & Tissue, da QIAGEN, método utilizado no presente estudo.

Considerando os resultados positivos nos testes ELISA TB e TCC, a prevalência de bovinos com tuberculose no rebanho foi de 9,8%. A presença de anticorpos anti-*M. bovis* em 17 bovinos reforça a ocorrência da tuberculose no rebanho avaliado. O fato dos animais positivos no ELISA TB, não terem sido positivos no exame intradérmico, não descaracteriza o quadro da doença. Considerando a relação inversa entre a resposta imune mediada por células e humoral contra *M. bovis*, o teste intradérmico e os testes sorológicos buscam mensurar respostas imunológicas diferentes, que se desenvolvem em estágios distintos da infecção (Chapinal et al. 2012). O progresso da resposta imunológica celular para humoral ocorre nos estágios mais avançados da tuberculose, por isso, os ensaios baseados em anticorpos, mostram-se úteis como testes complementares aos ensaios baseados na resposta celular, auxiliando na identificação de bovinos em estágios mais avançados da doença, com resultados falso-negativos na tuberculinização, devido ao estágio de anergia dos animais (Welsh et al. 2005; Waters et al. 2011).

Dos 16 bovinos positivos no TCC, 12 animais apresentaram lesões macroscópicas e histológicas sugestivas de PTB e em nove foram detectados o DNA de MAP. Embora seja o teste oficial para o controle da TB em diversos países, o teste intradérmico com PPD tem apresentado limitações, principalmente relacionados à especificidade (Menin et al. 2013), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* é considerado a principal causa de reações falso-positivas no exame intradérmico (Biet & Boschioli, 2014). O extrato bacteriano PPD é uma mistura complexa de proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucléicos, sendo muito desses componentes inclusive, compartilhados por inúmeras espécies de micobactérias (tuberculosas ou não). Essa complexidade antigênica é, provavelmente, a principal causa de ocorrência de reações inespecíficas nos testes de tuberculinização (Monaghan et al. 1994). As MNT podem coexistir no rebanho ou no mesmo animal, levando a erros de diagnóstico tanto a nível individual como de rebanho (Biet & Boschioli, 2014).

A presença de lesões macroscópicas e histológicas sugestivas de PTB, e a amplificação do material genético do MAP confirmam a ocorrência da doença no rebanho estudado. Dentre os positivos, todas eram fêmeas, com idade entre 7 meses e 9 anos e nenhum dos animais tinham histórico clínico da doença. De acordo com Mota et al. (2007) a ausência de sinais clínicos não descarta a presença da infecção no rebanho, nesses casos é necessário a combinação de técnicas de diagnóstico para a confirmação de animais infectados. Segundo Larsen et al. (1975), as manifestações clínicas são observadas geralmente após três anos de idade, porém o MAP pode permanecer incubado por um período que pode variar de menos de 6 meses até 15 anos, causando sinais clínicos tardios (Fiss et al. 2015).

O espessamento da mucosa intestinal, alterações nos vasos linfáticos do mesentério e nos linfonodos mesentéricos, que histologicamente correspondem a enterite, linfangite e linfadenite granulomatosa, são usualmente descritas na paratuberculose bovina (Chiodini et al. 1984). Estas lesões foram observadas nos animais necropsiados em diferentes graus de intensidade. A variação na intensidade das lesões está relacionada ao estágio da infecção, a imunidade do animal, a susceptibilidade do hospedeiro e à cepa de MAP (Menendez, 1990). A detecção do DNA de MAP confirma a etiologia da paratuberculose no rebanho estudado. Embora nenhum teste até o momento, seja suficientemente capaz de detectar todos os animais infectados, o diagnóstico da paratuberculose requer enfoque multidisciplinar com atenção dirigida as manifestações clínicas e patológicas, resposta imunológica e detecção do agente etiológico (Gomes et al. 2002).

Em nove carcaças identificou-se a presença de nódulos na submucosa do intestino delgado, cujas características macro e microscópicas sugerem o quadro de esofagostomose. As larvas desses parasitas formam nódulos no intestino, os quais tendem a ficar encapsulados por uma reação inflamatória por parte de hospedeiros previamente sensibilizados. Com o tempo os nódulos caseificam-se e calcificam-se (Tessele et al. 2013). De acordo com Mota (1985), as larvas de *Oesophagostomum radiatum* vivem em ambientes semelhantes aos de micobactérias atípicas, e nos dois primeiros estágios de vida, as larvas poderiam ingerir micobactérias atípicas existentes nesses locais juntamente com matéria orgânica, ou mesmo carrear mecanicamente as micobactérias até o organismo animal. Após penetração na mucosa do intestino do bovino, a presença do agente pode levar a sensibilização dos animais no teste intradérmico.

O exame ELISA paratuberculose detectou anticorpos anti Map em nove animais (2,7%), os quais eram todos negativos no TCC e nenhum apresentava manifestações clínicas sugestivas da paratuberculose. Estes animais representam uma importante categoria no controle da paratuberculose, pois além de não apresentarem sinais clínicos, eliminam intermitentemente o agente no ambiente e mantém a infecção no rebanho (Chiodini et al. 1984). A sensibilidade do exame depende do estágio da infecção, quando a doença encontra-se nos estágios iniciais ou latentes, a sensibilidade é baixa, aproximadamente 15%, e tende a aumentar (75%) com a evolução da doença para a fase clínica ou terminal (Collins et al. 2006; Timms et al. 2011). Embora os testes sorológicos não apresentem suficiente acurácia para o diagnóstico individual, são eficientes para determinar rebanhos infectados e permitem estimar a extensão do problema na propriedade suspeita (Riet-Correa & Driemeier, 2007).

Considera-se ainda a possibilidade da co-infecção da TB e PTB no rebanho do estudo. Infecções mistas de *M. avium* (incluindo MAP) e *M. bovis* já foram relatadas. Seva et al. (2014), tendo por objetivo caracterizar a resposta imune e o perfil de lesões em rebanhos infectados com *M. bovis* e MAP, identificaram que bovinos duplamente infectados, que apresentaram pequenos granulomas ou lesões iniciais de TB, foram positivos na PCR e sorologia de PTB, porém nenhuma lesão foi identificada para PTB. Já os animais que tiveram lesões extensas de TB, também apresentaram lesões difusas para PTB, demonstrando haver correlação positiva com a gravidade da patologia em animais co-infectados com TB e PTB. A intercorrência de bovinos reagentes no exame de tuberculinização com a paratuberculose foi também relatada por Balseiro et al. (2003). Os autores

detectaram lesões granulomatosas associadas à infecção por MAP em 28% (26/91) dos bovinos positivos no exame de tuberculinização. Observou-se também que na necropsia dos bovinos positivos no exame de tuberculinização, os granulomas estavam localizados exclusivamente nas áreas interfoliculares do tecido linfóide em 16,4% (15/91) dos animais. Outros granulomas foram identificados na lâmina própria da válvula ileocecal em 12% (11/91) dos bovinos. Por meio da técnica de imunohistoquímica os autores detectaram o MAP em 92% (24/26) dos animais com lesões de PTB. Vale ressaltar que em nenhum desses animais foi verificado a presença de sinais clínicos da PTB, assim como no presente estudo. Segundo Balseiro et al. (2003), a detecção de falsos positivos no exame de tuberculinização é importante particularmente nas áreas onde há incidência relativamente baixa da TB e pode ser atribuída, em parte, pela reatividade imunológica cruzada com outras infecções por micobactérias, em especial pelo MAP.

Outros estudos apontam que a co-infecção de *M. bovis* e MAP levaram a resultados não só falso-positivos, mas também falso-negativos (Biet & Boschirolì, 2014). Em co-infecções experimentais em que *M. avium* subsp. *avium* foi administrado anterior a *M. bovis*, os animais não reagiram no exame de tuberculinização da mesma maneira quando infectados apenas com *M. bovis* (Amadori et al. 2002), neste caso, tais resultados podem representar um obstáculo aos programas de erradicação da TB, uma vez que animais falso-negativos poderiam não ser detectados no exame intradérmico, se comportando como importantes fontes de infecção da doença. Por isso que, na prática, se o objetivo é erradicar a doença, a habilidade de um teste diagnóstico em detectar todos os animais infectados (não perdendo animais verdadeiramente infectados com resultado falso negativo) é mais importante do que erro causado pela detecção de falso-positivos (De la Rúa-Domenech et al. 2006; Seva et al. 2014). Apesar de não serem 100% específicos, países que conseguiram erradicar a TB, utilizaram a tuberculinização intradérmica como ferramenta básica em seus programas sanitários, este é sem dúvida o melhor teste a ser aplicado em rebanhos nos quais a doença é endêmica e em rebanhos controlados.

CONCLUSÃO

Nas condições de campo estudadas, a infecção por *M. avium* subsp. *paratuberculosis* pode ter causado reações inespecíficas no teste intradérmico de tuberculose. Apesar das limitações relacionadas à especificidade do teste intradérmico, do ponto de vista epidemiológico, a tuberculinização é o melhor teste disponível para o saneamento de rebanhos com tuberculose.

Agradecimentos: Os autores agradecem o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

REFERÊNCIAS

Álvarez J., Pérez A., Bezos J., Marqués S., Grau A., Saéz J.L., Mínguez O., De Juan L. & Domínguez L. 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in

- naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet. Microbiol.* 155 (1):38-43.
- Aranaz A., DeJuan L., Bezos J., Alvarez J., Romero B., Lozano F., Paramio J.L., López-Sánchez J., Mateos A. & Domínguez L. 2006. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 37 (4):593-606.
- Amadori M., Tagliabue S., Lauzi S., Finazzi G., Lombardi G., Telo P., Pacciarini L. & Bonizzi L. 2002. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the *avium/intracellulare* group. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49 (2):89-96.
- Ayres M., Ayres Júnior M., Ayres D. L., Santos A. S. 2005. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Versão 4.0. Belém: Instituto de desenvolvimento sustentável Mamirauá.
- Balseiro, A., Prieto, J.M., Espí, A., Perez, V., Garcia Marín, J.F., 2003. Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Vet. J.* 166, 210-212 .
- Berg S., Firdessa R., Habtamu M., Gadisa E., Mengistu A., Yamuah L., Ameni G., Vordermeier M., Robertson B.D., Smith N.H., Engers H., Young D., Hewinson R.G., Assefa A. & Gordon S.V. 2009. The burden of mycobacterial disease in Ethiopian cattle: Implications for public health. *Plos One.* 4 (4):e5068.
- Bezos J., Casal C., Romero B., Schroeder B., Hardegger R., Raeber A.J., López L., Rueda P. & Domínguez L. 2014. Current *ante-mortem* techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 97:44-52.
- Biet F., Boschioli M.L., Thorel M.F. & Guilloteau L.A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium intracellulare* complex (MAC). *Vet. Res.* 36 (3):411-436.
- Biet F. & Boschioli M.L. 2014. Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Res. Vet. Sci.* 97:69-77.
- Brasil. 2006. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da brucelose e tuberculose – PNCEBT. Brasil: MAPA/DAS/DAS, 2006. 184p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/fle/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso em 15 Maio 2016.
- Carvalho I.A., Silva V.O., Vidigal P.M.P., Silva-Júnior A. & Moreira M.A.S. 2012. Genetic evaluation of IS900 partial sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Brazilian isolates from bovine milk. *Trop. Anim. Health Prod.* 44 (7):1331-1334.
- Chiodini R.J., VanKruiningen H.J. & Merkal R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. 74 (2):218-262.
- Collins M.T., Gardner I.A., Garry F.B., Roussel A.J. & Wells S.J. 2006. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229:1912-1919.
- Corner L.A.L., Gormley E. & Pfeiffer D.U. 2012. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet. Microbiol.* 156 (1-2):162-171.
- De La Rua-Domenech R., Goodchild A.T., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Christiansen K.H. & Clifton-Hadley R.S. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81 (2): 190-210.

- Fiss L., Santos B.L., Albuquerque P.P.F., Mota R.A., Marcolongo-Pereira C., Adrien M.L., Soares M.P. & Schild A.L. 2015. Paratuberculose em bovinos de corte na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 35 (5):437-442.
- Gomes M.J.P., Driemeier D., Ribeiro V.R., Wunder Jr. E.A., Asanome W., Lanzon L.F. & Wald V.B. 2002. Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região Sul do Brasil. *Acta Scient. Vet.* 30(2):113-118.
- Kreeger J.M. 1991. Ruminant paratuberculosis – a century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3:373-383.
- Larsen A.B., Merkal R.S. & Cutlip R.C. 1975. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 5:255-257.
- Medeiros J.M.A., Garino Junior, F., Matos R.A.T., Costa V.M.M. & Riet-Correa F. 2012. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos do semiárido paraibano. *Pesq. Vet. Bras.* 32 (8):697-700.
- Menendez L.A.C. 1990. Ovis: tratado de patologia y produccion ovina. Luzán 5, Madrid, p.39-47.
- Menin A., Fleith R., Reck C., Marlow M., Fernandes P., Pilati C. & Báfica A. 2013. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *Plos One.* 8 (1):e53884.
- Monaghan M.L., Doherty M.L., Collins J.D., Kazda J.F. & Quinn P.J. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40 (1-2):111-124.
- Mota P.M.P.C. 1985. Estudo da esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas no diagnóstico da tuberculose bovina. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-8R3KDH>> Acesso em: 15 jul 2016.
- Mota R. A., Pinheiro-Junior J.W., Gomes M.J.P., Peixoto R.M., Maia F.C.I., Brito M.F. Chies J.A.B. Snel G.G.M., Bercht B.S., & Juffo G.D. 2007. Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. *Arq. Inst. Biol.* 74 (2):73-79.
- Moura A., Hodon M.A., Soares Filho P.M., Issa M.A., Oliveira A.P.F., Fonseca Junior A.A. 2016. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR. *Cienc. Rur.* 46 (7):1223-1228.
- OIE. Office International des Epizooties. 2013. Chapter 2.4.7. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.
- Pollock J.M., Rodgers J.D., Welsh M.D. & McNair J., 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis. The role of experimental models of infection. *Vet. Microbiol.* 112 (2-4):141-150.
- Proding W.M., Brandstätter A., Naumann L., Pacciarini M., Kubica T., Boschioli M.L., Aranaz A., Nagy G., Cvetnic Z., Ocepek M., Skrypnik A., Erler W., Niemann S., Pavlik I. & Moser I. 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 43 (10):4984-4992.
- Rahim Z., Möllers M., Koppele-Vije A., Beer J., Zaman K., Matin M.A., Kamal M., Raquib R., Soolingen D., Baqi M.A., Heilmann F.G.C., & Zanden A.G.M. 2007. Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 38 (4):706-713.

- Riet-Correa F. & Driemeier D. 2007. Paratuberculose, p.407-414. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equinos. 1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Sales M.L., Fonseca Junior A.A., Orzil L., Alencar A.P., Silva M.R., Issa M.A., Soares Filho P.M., Lage A.P. & Heinemann M.B. 2014. Validation of a real-time PCR assay for the molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis*. Braz. J. Microbiol. 45 (4):1362-1369.
- Seva J., Sanes J.M., Ramis G., Mas A., Quereda J.J., Villareal-Ramos B., Villar D. & Pallares F.J. 2014. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 171:139-146.
- Silva, E. B. 2005. Diagnóstico de paratuberculose em bovinos de corte do estado do Pará-Brasil. 2005. Pará. 60p. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<http://repositorio.ufpa.br:8080/jspui/handle/2011/4714>> Acesso em: 02 Jun 2016.
- Smith N.H., Gordon S.V., De La Rua-Domenech R., Clifton-Hadley R.S. & Hewinson G. 2006. Bottleneck and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nat. Rev. Microbiol. 4 (9):670-681.
- Taddei R., Barbieri I., Pacciarini M.L., Fallacara F., Belletti G.L. & Arrigoni N. 2008. *Mycobacterium porcium* strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. Vet. Microbiol. 130:338--347.
- Tessele B., Brum J.S. & Barros C.S.L. 2013. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. Pesq. Vet. Bras. 33 (7):873-889.
- Thakur A., Sharma M., Katoch V.C., Dhar P. & Katoch R.C. 2012. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from cattle: possible public health relevance. Indian J. Microbiol. 52 (2):289-291.
- Timms V.J., Gehringer M.M., Mitchell H.M., Daskalopoulos G. & Neilan B.A. 2011. Review. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? J. Microbiol. Methods 85:1-8.
- Trylich C. 1960. Diagnosis and no visible lesions in tuberculosis of cattle. Can. Vet. J. 1 (12):545-550.
- Waters W.R., Buddle, B.M., Vordermeier H.M., Gormley E., Palmer M.V., Thacker T.C., Bannantine J.P., Satbel J.R., Linscott R., Martel E., Milian F., Foshaug W. & Lawrence J.C. 2011. Development and evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. Clin. Vaccine Immunol. 18 (11):1882-1888.
- Welsh M.D., Cunningham R.T., Corbett D.M., Girvin R.M., McNair J., Skuce R.A., Bryson D.G. & Pollock J.M. 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Immunology. 114 (1):101-111.
- Wood P.R. & Jones S.L. 2001. Bovigam: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis. 81 (1-2): 147-155.
- Yamasaki E.M., Tokarnia C.H., Galvão A., Gomes M.J.P., Chies J.A.B., Veit T.D., Aragão A.P. & Brito M.F. 2010. Aspectos clínico patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. Pesq. Vet. Bras. 30 (11):921-932.

Legendas das Tabelas

Tabela 1. Resultados do ELISA *M. bovis* em comparação com o Teste Cervical Comparativo (TCC) para o diagnóstico da tuberculose em bovinos provenientes de um rebanho leiteiro do município de Uberlândia-MG, 2017.

Legendas das Figuras

Fig. 1. Mucosa duodenal espessada com aspecto avermelhado, enrugado e/ou cerebróide, proveniente de bovino positivo no teste cervical comparativo para tuberculose.

Fig. 2. Linfonodo mesentérico com áreas multinodulares irregulares e brancacentas na região cortical e presença de líquido de aspecto leitoso, proveniente de bovino positivo no teste cervical comparativo para tuberculose.

Fig. 3. Fotomicrografia de intestino delgado com mucosa e submucosa apresentando infiltrado inflamatório. HE. Obj. 4x.

Fig. 4. Fotomicrografia de linfonodo mesentérico com presença de granuloma. HE. Obj. 4x.

Tabela 1.

ELISA <i>M. bovis</i>	TCC		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	0	16	16
Negativo	17	301	318
Total	17	317	334

Concordância: $0 + 301 / 334 = 90,1\%$

Kappa: -0,05

$X^2: 0 \quad p > 0.05$

Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

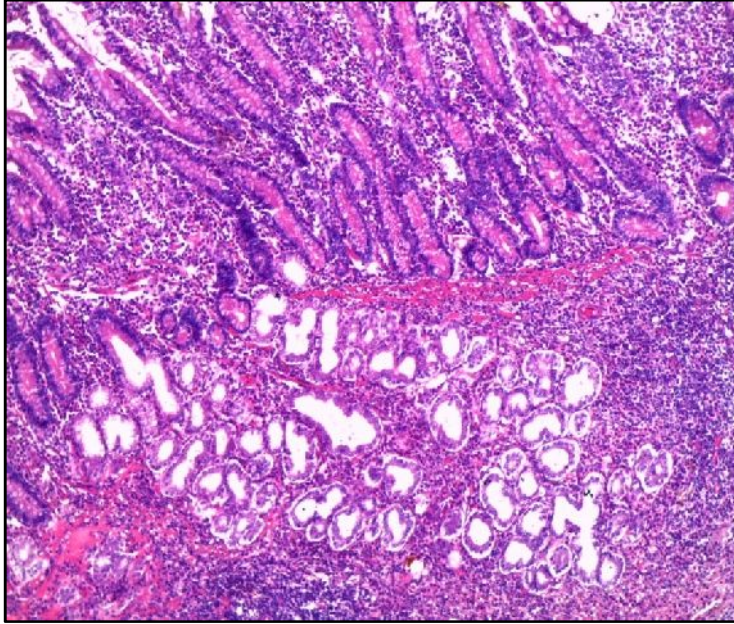
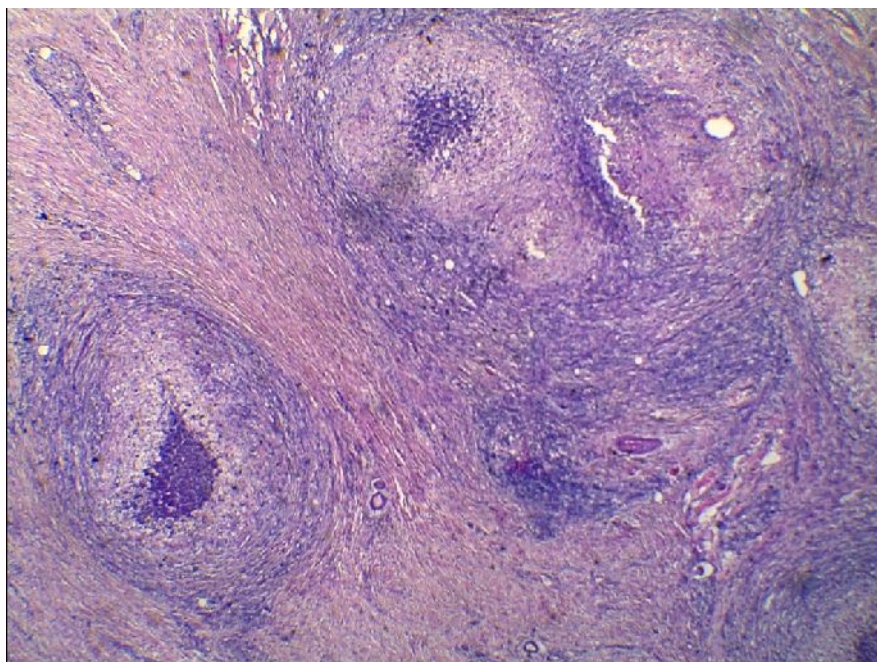


Fig. 4.



CAPÍTULO 4

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR *Mycobacterium avium* SUBSPÉCIE *paratuberculosis* E PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS

Artigo a ser submetido no periódico

Semina: Ciências Agrárias

**HERD-LEVEL PREVALENCE AND ASSOCIATED RISK FACTORS FOR
Mycobacterium avium SUBSPECIES *paratuberculosis* AND BOVINE LEUKEMIA VIRUS
ON DAIRY HERDS**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR
Mycobacterium avium SUBSPÉCIE *paratuberculosis* E PELO VÍRUS DA LEUCOSE
BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS**

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) and bovine leukemia virus (BLV) are common agents found in dairy herds around the world, leading to significant economic losses, caused both by reduce of milk production and premature culling. A cross-sectional study was carried out to evaluate the epidemiological situation of paratuberculosis (PTB) and bovine enzootic leukosis (BEL) in herds of the municipality of Lagoa Formosa - MG. 40 milk production properties were randomly selected and within each one were collected blood samples from females of different breeds and ages. A total of 236 samples were submitted to ELISA MAP antibody test and agar gel immunodiffusion test (AGID) for BEL. An epidemiological questionnaire was administered in the farms to identify risk factors associated with PTB and BEL. Prevalence in the municipality for PTB was 20% (95% CI: 7,60% – 32,39%) for herds and 6% for animals (95% CI: 2,98% – 9,02%). Prevalence of BEL was 85% (95% CI: 82.16% - 87.84%) for herds and 50.42% (95% CI: 49,51% - 51,32%) for animals. The risk factors identified in the logistic regression analysis for PTB were: age (OR = 0,088 [95% CI: 0.0052 - 1.508]), creation of calves with adults (OR = 41.45 [95% CI: 5.295 - 324.5]) and contact of calves with feces of adult animals (OR = 5.008 [95% CI: 1,095 - 22,91]). The risk factors identified in the logistic regression analysis for BEL were: blood transfusion (OR = 2.32 [95% CI: 1.34 - 4.038]), veterinary medical assistance (OR = 2.61 [95% CI: 1.53-4.468]) and natural mount (OR = 2.27 [95% CI: 1.117-4.639]). It was concluded that 6% of the bovines presented evidence of infection caused by MAP and 50.42% by BLV. Considering the occurrence of cases of PTB and BEL in the studied, it is suggested that framers and veterinarians take greater care in adopting sanitary measures for these diseases, incorporating surveillance elements based on the risks identified in the study.

Key-words: Paratuberculosis, bovine leukemia, AGID, ELISA

Resumo

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) e o vírus da leucose bovina (VLB) são agentes frequentemente encontrados em rebanhos leiteiros no mundo, que geram importantes perdas econômicas, causadas tanto pela diminuição da produção, quanto pelo descarte prematuro dos animais. Realizou-se um estudo transversal para avaliar a situação epidemiológica da paratuberculose bovina (PTB) e leucose enzoótica bovina (LEB) em rebanhos leiteiros do município de Lagoa Formosa MG. Foram selecionadas aleatoriamente 40 propriedades de produção leiteira e, dentro de cada uma, foram colhidas amostras de sangue de vacas de diferentes raças e idades. Um total de 236 amostras foram submetidos aos exames de ELISA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e imunodifusão em gel de Agar (IDGA) para LEB. Um questionário epidemiológico foi aplicado em cada fazenda para identificar os fatores de risco associados à PTB e LEB. A prevalência de focos de PTB no município foi de 20% (IC 95%: 7,60% – 32,39%) em rebanhos e 6% (IC 95%: 2,98% – 9,02%) para animais. Para LEB a prevalência foi de 85% (IC 95%: 82.16% - 87.84%) em rebanhos e 50,42% (IC 95%: 49,51% – 51,32%) para animais. Os fatores de risco identificados na análise de regressão logística para PTB foram: idade (OR = 0,088 [IC 95%: 0.0052 - 1.508]), manejo dos bezerros após o nascimento (OR = 41,45 [IC 95%: 5.295 - 324.5]) e contato dos bezerros com fezes dos animais adultos (OR = 5,008 [IC 95%: 1.095 - 22.91]). Os fatores de risco identificados na análise de regressão logística para LEB foram: transfusão sanguínea (OR = 2,32 [IC 95%: 1,34 – 4,038]), assistência médica veterinária (OR = 2,61 [IC95%: 1.53 – 4,468]) e monta natural (OR = 2,27 [IC 95%: 1,117 – 4,639]). Diante a ocorrência de casos de PTB e LEB nos rebanhos estudados, sugere-se maior atenção dos produtores e médicos veterinários na adoção de medidas sanitárias para evitar essas doenças, incorporando elementos de vigilância com base nos riscos identificados no estudo.

Palavras-chave: Paratuberculose, leucemia bovina; IDGA; ELISA

Introdução

Em 2016, o Brasil produziu 33,62 bilhões de litros de leite. Minas Gerais foi o estado com maior produção do país, responsável por 26,7% da produção nacional (IBGE, 2017). Essa importante representatividade comercial no mercado agropecuário alerta para a adoção de medidas sanitárias efetivas e aprimoramento na investigação de

doenças nos rebanhos, para garantir competitividade e qualidade aos produtos. Entre as doenças que afetam a sanidade dos rebanhos, destaca-se a paratuberculose (PTB) e a leucose enzoótica bovina (LEB) (SUN et al., 2015).

A PTB também chamada de Doença de Johne é uma infecção caracterizada por enterite granulomatosa crônica, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que acomete bovinos, ovinos, caprinos e ruminantes silvestres (CHIODINI et al., 1984; FECTEAU, 2017). A principal forma de transmissão se dá por via fecal-oral (DORÉ et al., 2012), mas também pode ocorrer pela ingestão do colostro e leite proveniente de vacas em estágio sub-clínico ou clínico (SWEENEY et al., 2012), e ainda por via intra-uterina (WHITTINGTON; WINDSOR, 2009).

A LEB é causada por um RNA vírus da família *Retroviridae*, denominado Vírus da Leucose Bovina (VLB). A principal forma de transmissão do VLB é por via horizontal, que ocorre pela transferência do vírus presente no sangue, por meio de práticas como a reutilização de materiais contaminados sem a antissepsia adequada. Agulhas, luvas de palpação retal, instrumentos cirúrgicos, máquinas para tatuagem, ferramentas de casqueamento ou qualquer material contaminado oferecem risco para a transmissão do VLB (CAMARGOS et al., 2004; FLORES, 2007), assim como a presença de artrópodes hematófagos (KOBAYASHI et al., 2014). Classicamente são descritas duas formas de manifestação da doença, a forma benigna que cursa com linfocitose persistente, e a forma maligna que se constitui da formação do linfossarcoma (DOMENECH et al., 2000).

Mesmo sem apresentarem sintomatologia clínica tais doenças podem provocar perdas econômicas significativas, caracterizadas pela diminuição na produção de leite e carne, redução na eficiência alimentar, condenação de carcaças em frigoríficos, descarte prematuro ou morte de animais; redução na fertilidade, aumento na incidência de mastite (DIGIACOMO, 1992; GARCIA; SHALLOO, 2015), perdas na exportação para mercados que requerem animais livres da infecção, custos com o diagnóstico e barreiras econômicas no comércio internacional (CORDEIRO et al., 1994).

Considerando o impacto econômico da PTB e LEB e a importância de uma análise epidemiológica para subsidiar medidas profiláticas, objetivou-se com realizar um estudo soroepidemiológicos da PTB e LEB em rebanhos bovinos na maior bacia leiteira do estado de Minas Gerais.

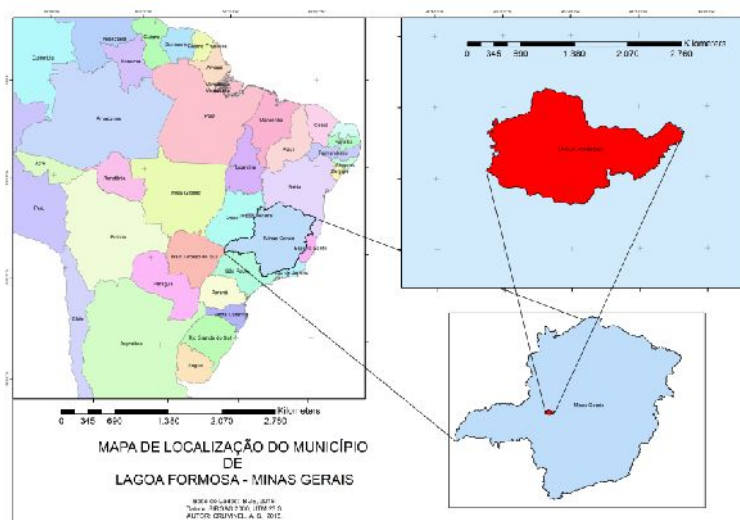
Material e Métodos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), sob o protocolo n.º 54/17.

Local

O estudo foi realizado no município de Lagoa Formosa localizado na região do Alto Paranaíba, estado de Minas Gerais (Figura 1). A localização geográfica do município encontra-se nas coordenadas 18° 46' 44" de latitude sul e 46° 24' 28" longitude oeste. O município ocupa uma área de 840,920Km² e apresenta clima tropical, a temperatura média é de 22°C e a pluviosidade de 1462 mm/ano (IBGE, 2015).

Figura 1. Localização do município de Lagoa Formosa no estado de Minas Gerais, Brasil.



Delineamento amostral

O rebanho de bovinos do município é composto por 92.563 cabeças (IBGE 2015), sendo 47.038 acima de 24 meses, distribuído em 1.208 propriedades destinadas à produção de leite e corte. Optou-se por trabalhar em Lagoa Formosa devido o município estar localizado na maior bacia leiteira do estado de Minas Gerais, sendo um dos 20 municípios de maior produção de leite do Brasil (IBGE, 2017). Para determinação do tamanho da amostra foi utilizado o método de estimativa de prevalência em amostra aleatória simples (THRUSFIELD, 2004). Considerou-se prevalência estimada de 75,8%

da paratuberculose para rebanhos bovinos (FERNÁNDEZ-SILVA et al., 2014) e 80,89% para Leucose (AMBRÓSIO, 2015), com nível de confiança de 95% e erro estatístico de 8%, totalizando o tamanho mínimo de 200 amostras. Optou-se por trabalhar com 236 amostras, como margem de segurança.

Foram selecionadas aleatoriamente 40 propriedades nas regiões norte, sul, leste e oeste, conforme o zoneamento disponibilizado pela prefeitura do município. Foram colhidas em média seis amostras por fazenda, num total de 10 fazendas por região. Os rebanhos eram constituídos de animais de várias raças e idades, que se encontravam em diferentes estágios de lactação e eram criados em sistema intensivo ou semi-intensivo e submetidos à ordenha mecânica e/ou manual.

Critérios de inclusão e exclusão

A coleta das amostras foi realizada exclusivamente de vacas em lactação. Os animais amostrados pertenciam a grupos em idade reprodutiva igual ou superior a 20 meses e foram escolhidos independente do padrão racial, tipo de ordenha, manejo nutricional e sanitário. Selecionou-se os animais que atendiam a esses critérios, conforme a disponibilidade do produtor e da fazenda.

Amostras

Foram colhidas 236 amostras de sangue por punção da veia coccígea, com seringas estéreis de 10mL e agulha 25mm x 0,7mm. O sangue foi armazenado em tubos sem anticoagulante e mantido sob refrigeração em caixas de isopor com gelo. Encaminhou-se as amostras ao Laboratório de Doenças Infecciosas do UNIPAM, e centrifugadas a 3.000 x g, por cinco minutos para a extração do soro. As amostras foram congeladas em microtubos do tipo *ependorf* à temperatura de -20°C até a realização dos exames.

Exames de diagnóstico

ELISA PTB

O diagnóstico sorológico da PTB foi realizado por meio de um kit comercial de ELISA indireto *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Antibody Test – IDEXX®. O exame foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, de acordo com instruções do fabricante.

Os valores de densidade óptica (DO) das amostras e controles foram medidos em espectrofotômetro de placas a 450nm. Para validação do exame utilizou-se como critérios: $CP\bar{x} \geq 0,350$ e $CP\bar{x} / CN(DO\ 450) \geq 3,00$. O cálculo dos resultados foi determinado pela relação: $100 \times [(Amostra\ A(450) - CN(DO\ 450) / (CP\bar{x} - CN(DO\ 450))]$. A interpretação dos resultados foi realizada considerando-se os seguintes parâmetros: amostras com relação $A/P\% \leq 45\%$ Negativas; $45\% < A/P\% < 55\%$ Suspeitas e $A/P\% \geq 55\%$ Positivas.

IDGA LEB

A presença de anticorpos anti-VLB foi avaliada pelo teste comercial de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), do Laboratório TECPAR[®], conforme instruções do fabricante. A leitura e interpretação do exame foram realizadas com 24, 48 e 72 horas de incubação, em ambiente escuro com o auxílio de um foco de luz forte, a fim de verificar o aparecimento de linhas de precipitação.

Inquérito epidemiológico

Um questionário estruturado incluindo perguntas fechadas foi elaborado e aplicado aos produtores a fim de obter informações sobre os principais fatores de risco associados à epidemiologia da PTB e LEB. As variáveis investigadas na PTB foram: idade; presença de diarreia crônica; consumo de leite; assistência veterinária; manejo dos bezerros após o nascimento; limpeza do úbere antes do fornecimento de leite aos bezerros; contato dos bezerros com as fezes de animais adultos; presença de esterqueiras e comercialização de animais. Para a LEB investigou-se as variáveis: idade; utilização de agulhas descartáveis; reutilização de luvas obstétricas; assistência veterinária; presença de moscas hematófagas; comercialização de animais; aplicação de ocitocina durante ordenha; transfusão sanguínea e tipo de manejo reprodutivo (monta natural e/ou inseminação artificial).

Análise estatística

Para o cálculo da frequência foi estabelecido a relação do número de bovinos com PTB e LEB em relação ao número de animais amostrados, utilizando-se análise estatística descritiva, por meio de frequência absoluta e relativa. Para verificar a associação entre as variáveis investigadas e o *status* sorológico, realizou-se análise univariada por meio do teste qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher quando

necessário. Posteriormente, as variáveis foram utilizadas para construir um modelo de regressão logística, considerando como variável dependente o exame sorológico, pelo teste não paramétrico *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95% (THRUSFIELD, 2004). O valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo estatisticamente. As análises foram realizadas no programa Graphpad versão 5.0 (San Diego, Califórnia, USA).

Resultados e Discussão

Soroprevalência e fatores de risco para MAP

Dos 40 rebanhos avaliados oito (20%; IC 95%: 7,60% – 32,39%) tinham pelo menos um animal positivo para PTB. A prevalência nos focos variou de 14,28% a 66,66% com média de 30,38%. Entre os 236 bovinos examinados, 14 (6%; IC 95%: 2,98% – 9,02%) foram reagentes (Tabela 1). Os animais não apresentavam sintomatologia clínica sugestiva de PTB.

Bovinos assintomáticos positivos no teste ELISA PTB são considerados importantes fontes de infecção, pois além de não apresentarem sintomatologia clínica podem eliminar o bacilo de forma intermitente no ambiente e, assim, contaminar água e alimentos. (COLLINS, 2011; FECTEAU, 2017). A não identificação dos animais positivos pode contribuir para a manutenção da doença no rebanho, uma vez que na maior parte dos casos o animal se infecta quando bezerro e permanece no rebanho eliminando o agente (SÁ et al., 2013).

A prevalência de anticorpos anti-MAP em 20% dos rebanhos, encontrada neste estudo, pode ser ainda maior, isso porque a doença possui período de latência relativamente longo, de dois até dez anos e os níveis de anticorpos contra MAP só são detectados no final desse estágio, por testes sorológicos como o ELISA (SUN et al., 2015; FECTEAU, 2017). Durante o período subclínico, embora os animais ainda não manifestem sinais da PTB, estudos mostram que o gado infectado já apresenta redução na produção de leite e menor eficiência reprodutiva (GONDA et al., 2007; FECTEAU, 2017). Embora note-se o aumento do número de estudos da PTB nos rebanhos nacionais (VILAR et al., 2015; SÁ et al., 2013; COSTA et al., 2010; YAMASAKI et al. 2010; ACYPRESTE et al., 2005; FONSECA et al., 2000), a doença é ainda desconhecida pela maioria dos produtores da região, e mesmo tendo sido identificado prevalência de 20% em rebanhos, acredita-se que maioria dos produtores não estejam cientes dos prejuízos econômicos que a doença pode causar.

Tabela 1. Número de bovinos examinados por rebanho e sororeagentes para Paratuberculose e Leucose Enzoótica Bovina, em rebanhos leiteiros do município de Lagoa Formosa, MG, 2017.

Rebanho	Bovinos					
	N	n	ELISA PTB	(%)	IDGA LEB	(%)
A	63	4	0	-	0	-
B	109	6	0	-	4	66,66
C	57	5	0	-	0	-
D	143	5	0	-	0	-
E	126	5	0	-	2	40
F	105	7	0	-	2	28,57
G	127	5	0	-	1	20
H	136	7	0	-	5	71,42
I	250	6	0	-	5	83,33
J	60	7	0	-	0	-
K	326	6	0	-	5	83,33
L	60	6	0	-	1	16,66
M	758	5	0	-	5	100
N	110	5	0	-	2	40
O	90	6	0	-	2	33,33
P	140	6	0	-	6	100
Q	320	5	0	-	2	40
R	400	7	1	14,28	4	57,14
S	120	6	0	-	3	50
X	600	7	0	-	6	85,71
W	138	7	2	28,57	4	57,14
Y	180	7	0	-	6	85,71
Z	65	5	0	-	1	20
AA	60	7	1	14,28	5	71,42
AB	87	7	0	-	3	42,85
AC	98	7	0	-	4	57,14
AD	68	5	0	-	5	100
AE	160	8	0	-	2	25
AF	83	5	0	-	4	80
AG	80	6	0	-	3	50
AH	84	6	0	-	0	-
AJ	260	6	4	66,66	3	50
AK	1000	7	0	-	6	35,71
AL	250	7	1	14,28	3	42,85
AM	64	5	3	60	4	80
NA	98	4	0	0	2	50
AO	326	7	0	0	4	57,14
AP	70	5	0	0	0	-
AQ	83	4	1	25	2	50
AR	113	5	1	20	3	60
TOTAL	7467	236	14	6	119	50,42

N= Total de bovinos por rebanho

n= Total de bovinos utilizados no estudo

A prevalência de 20% de focos da PTB demonstra que a doença encontra-se presente nos rebanhos leiteiros avaliados. Estudos sobre a ocorrência da PTB são raros no estado de Minas Gerais e não há disponível levantamento com dados oficiais a respeito da situação epidemiológica no Brasil. Levantamentos realizados em outras regiões brasileiras demonstraram prevalência de rebanhos maior do que a relatada no presente estudo, como no estado de Goiás com 60,24% (ACYPRESTE et al., 2005); Rio de Janeiro com 40% (YAMASAKI et al. 2010); Paraíba com 34,5% (VILAR et al., 2015) e São Paulo com 37,9% (FONSECA et al., 2000); prevalências menores foram relatadas em Pernambuco com 2,7% (SÁ et al., 2013) e Espírito Santo com 11,4% (COSTA et al., 2010).

Quanto aos fatores de risco investigados no inquérito epidemiológico, observou-se associação significativa do MAP com as variáveis idade ($p=0,0237$), manejo dos bezerros após o nascimento ($p<0.0001$) e contato de bezerros com fezes de animais adultos ($p=0,0258$) (Tabela 2).

Na análise de regressão logística identificou-se como fator de risco associado à infecção por MAP, que fêmeas bovinas acima de quatro anos de idade apresentaram mais chance de infecção, quando comparadas às fêmeas entre 20 e 48 meses. De acordo com Sun et al. (2015), a soroprevalência da PTB aumenta significativamente com a idade. Rebanhos leiteiros criados em sistema intensivo podem ter o risco aumentado de transmissão devido ao maior tempo de exposição contínua aos organismos na pastagem (FECTEAU et al., 2010). A maior quantidade de animais adultos positivos, encontrada neste estudo, pode estar ainda relacionada ao método de diagnóstico utilizado, uma vez que os níveis de anticorpos contra o MAP só são identificados no final do período de incubação da doença, o qual pode durar de dois até 10 anos (VILAR et al., 2015; FECTEAU, 2017). A resistência à infecção pelo MAP aumenta com a idade (WINDSOR; WHITTINGTON, 2010). Tal resistência, no entanto, pode ser superada pela pressão de infecção. Bovinos adultos expostos a ambientes, forragens e água extremamente contaminados pelo agente, podem apresentar risco significativo para a infecção (ROSSITER; BURHANS, 1996; FECTEAU, 2017).

A variável manejo dos bezerros após o nascimento apresentou significância ($p<0,0001$). Nos rebanhos onde após o nascimento dos bezerros existia o contato frequente com os bovinos adultos, identificou-se $OR= 41,45$. Na PTB geralmente a infecção ocorre nos primeiros meses de vida, e os bovinos que adoecem normalmente são aqueles infectados nas primeiras semanas (CHIODINI et al., 1984). Um dos

mecanismos possivelmente relacionados a essa maior susceptibilidade é devido o intestino do bezerro que lhe permite absorver imunoglobulinas do colostro, representar uma barreira permissiva para o agente (WHITTINGTON et al., 2004). Evitar o contato de animais jovens com adultos pode auxiliar no controle da doença, visto que a transmissão do MAP ocorre principalmente pela ingestão de pastos contaminados ou durante a ingestão de colostro ou leite em úberes sujos com fezes contaminadas (SÁ et al., 2013; VILAR et al., 2015).

Tabela 2. Distribuição das vacas com paratuberculose conforme os fatores de risco avaliados, no município de Lagoa Formosa - MG, 2017.

Variável	Fêmeas bovinas			OR*	IC 95%	P
	Total	Regentes	Frequência (%)			
Idade						
20 – 48 meses	62	0	0	0,088	0.0052 - 1.508	0,0237
> 4 anos	174	14	8,04			
Diarréia crônica						
Sim	227	14	6,16	1,290	0.07144 - 23.31	1,0000
Não	9	0	0			
Esterqueira						
Sim	230	14	6,08	0,8707	0.0466 - 16.24	1,0000
Não	6	0	0			
Comércio animais						
Sim	104	6	5,76	0,9490	0.3186 - 2.827	1,0000
Não	132	8	6,06			
Manejo bezerros						
Junto adultos	67	13	19,40	41,45	5.295 - 324.5	<0.0001
Separado adultos	169	1	0,59			
Assistência veterinária						
Sim	140	9	6,42	1,250	0.4056 - 3.854	0,7849
Não	96	5	5,20			
Limpeza úbere						
Sim	15	0	0	0,461	0.0262 - 8.115	0,6082
Não	221	14	6,33			
Consumo de leite						
Sim	205	11	5,36	0,486	0.1272 - 1.859	0,3899
Não	31	3	9,67			
Contato bezerro com fezes adulto						
Sim	133	12	9,02	5,008	1.095 - 22.91	0,0258
Não	103	2	1,94			

*Odds Ratio; p <0,05 demonstra diferença significativa.

Foi identificada também associação entre o MAP e a variável contato de bezerros com fezes de animais adultos (OR=5,008). Segundo Marcé et al. (2011), a redução na exposição de bezerros suscetíveis a qualquer ambiente contaminado por animais adultos, leva a redução acentuada na prevalência da PTB. A adoção desta medida poderia levar ao desaparecimento da infecção se a exposição fosse diminuída em 90%. Segundo o autor impedir a exposição de bezerros a fezes de animais adultos é essencial para controlar a transmissão do MAP num rebanho leiteiro. De acordo com Doré et al. (2012), o contato de bezerros com as fezes de vacas adultas infectadas por MAP é considerado o fator de risco mais importante na transmissão da doença aos bezerros.

Soroprevalência e fatores de risco para VLB

Em 85% dos rebanhos (38/40, IC 95%: 82.16% - 87.84%) foram identificados animais reagentes para o VLB e a prevalência de focos variou de 16,66% a 100%, sendo que em três propriedades (M, P e AD) todos os animais examinados foram reagentes. A prevalência em animais foi de 50,42% (119/236, IC 95%: 49,51% – 51,32%) (Tabela 1). Levantamentos sorológicos realizados em diferentes regiões do Brasil têm demonstrado resultados variados quanto à ocorrência da leucose, com frequência média de 27,60% de animais reagentes (BIRGEL JUNIOR et al., 1995). Tais variações podem estar relacionadas às condições geográficas de cada região, o tipo e tamanho do rebanho testado e a sensibilidade e especificidades dos métodos de diagnóstico utilizados (SUN et al., 2015).

De acordo com critérios estabelecidos por Shettigara et al. (1986), a prevalência observada neste estudo (50,42%) é caracterizada como alta (maior que 30%). Também em Minas Gerais, Ambrósio (2015), identificou prevalência de 80,89% em 1392 animais testados no sul de Minas Gerais. Ainda na região Sudeste observou-se prevalência de 27,9% em 409 bovinos no Espírito Santo (STARLING et al., 2013). Estudos realizados em rebanhos leiteiros da região Norte do país revelou prevalência de 9,7% em 1.060 bovinos no Acre e 23% em 1.060 bovinos em Rondônia (ABREU et al., 1990); 26% em 668 bovinos no Pará (MOLNÁR et al., 1999); 9,6% em 661 bovinos no Amazonas (CARNEIRO et al., 2003) e 27,8% em 489 bovinos no Tocantins (JULIANO et al., 2014). Na região Nordeste 27,8% em 341 bovinos em Alagoas (PINHEIRO-JUNIOR et al., 2013); na região Centro-oeste 40,83% em 120 bovinos em Catalão, Goiás (BARROSO, 2015) e na região Sul 56,34% em 268 bovinos no Paraná

(BARROS-FILHO et al., 2010) e 9,2% de 39.799 bovinos no Rio Grande do Sul (MORAES, 1996).

Em todos os rebanhos onde foram identificados animais reagentes para o MAP observou-se também a ocorrência de reagente para o VLB, sendo que a co-infecção se deu em 85% (12/14) dos casos. O VLB pertence ao gênero *Deltaretrovirus* e infecta preferencialmente linfócitos tipo B, levando o animal ao quadro de imunossupressão generalizada, caracterizado pela queda na produtividade e múltiplos efeitos sobre a saúde dos animais (FLORES, 2007). Segundo Emanuelson et al. (1992), bovinos infectados pelo VLB apresentam tendência acentuada de adquirirem doenças de etiologia infecciosa. A infecção pelo VLB pode ter contribuído para maior susceptibilidade dos bovinos a se infectarem pelo MAP.

Em relação aos fatores de risco analisados para VLB, as variáveis transfusão sanguínea ($p=0,0027$), assistência veterinária ($p=0,0005$) e manejo reprodutivo ($p=0,0319$) apresentaram associação significativa com a presença de anticorpos anti-VLB (Tabela 3).

A variável transfusão sanguínea foi identificada como fator de risco para o VLB ($p=0,0027$), sendo que nas propriedades onde pratica-se o procedimento entre os animais, identificou-se OR igual a 2,32. A transmissão do VLB está estritamente relacionada às práticas de manejo, principalmente as mais tecnicizadas. O procedimento de transfusão de sangue apresenta importante risco na transmissão da LEB, uma vez que as maiores taxas de transferência de linfócitos infectados ocorrem, por exemplo, nesse tipo de atividade (SILVA et al., 2008), embora quantidades de sangue tão pequenas quanto 0,1µl já sejam capazes de transmitir o vírus (FLORES, 2007).

O manejo reprodutivo também foi identificado como fator de risco para o VLB. Nos rebanhos onde se realiza a monta natural observou-se OR igual a 2,27 vezes a mais, quando comparado aos rebanhos em que se pratica a inseminação artificial aliada à monta natural. Segundo Flores (2007), a transmissão pela monta natural pode ocorrer, sendo uma forma de disseminação do vírus de touros infectados para fêmeas, tal fato ocorre devido à possível presença de linfócitos no trato reprodutivo, e não necessariamente à presença do VLB nos espermatozóides. Considerando que pequena quantidade de sangue pode ser transferida durante a cópula, a reprodução por monta natural pode ser uma via de infecção (WHITTIER, 1990). De acordo com Braga et al. (1998), a transmissão através da inseminação artificial só ocorre se o sêmen for contaminado com sangue durante a colheita, o que foi comprovado por Del Fava e

Pituco (2004), que ao avaliarem sêmen de touros soropositivos utilizados para inseminação artificial, demonstraram que esta via não tem importância na transmissão da LEB.

Tabela 3. Distribuição das vacas com leucose conforme os fatores de risco avaliados, no município de Lagoa Formosa - MG, 2017.

Variável	Fêmeas bovinas			OR*	IC 95%	P
	Total	Regentes	Frequência (%)			
Idade						
20 - 48 meses	62	27	43,54	0,6876	0.38 - 1.23	0,2377
> 4 anos	174	92	52,87			
Agulhas descartáveis				0,64	0.17 – 2.34	0,5373
Sim	10	4	40,00			
Não	226	115	50,88			
Reutilização luvas obstétricas				1,58	0,90 - 2,74	0,1243
Sim	161	87	54,03			
Não	75	32	42,66			
Uso ocitocina				11,29	0,61- 206,6	0,0599
Sim	5	5	100			
Não	231	114	49,35			
Transfusão sangue				2,32	1.34 – 4.038	0,0027
Sim	83	53	63,85			
Não	153	66	43,13			
Comércio animais				1,36	0.81 – 2.294	0,2410
Sim	104	57	54,80			
Não	132	62	46,96			
Assistência veterinária				2,61	1.53 - 4.468	0,0005
Sim	140	84	60,00			
Não	96	35	36,84			
Manejo reprodutivo				2,27	1.117 - 4.639**	0,0319
Monta natural	51	30	58,82			
IA	102	57	55,88			
Monta natural + IA	83	32	38,55			

*OddsRatio; **OR realizado para a maior diferença entre as proporções; IA: inseminação artificial; $p < 0,05$ demonstra diferença significativa.

Para a variável assistência veterinária, observou-se que nas propriedades que possuem o auxílio técnico, os animais apresentaram um risco 2,32 vezes maior de terem a infecção ($p=0,0005$). Sabe-se que o principal mecanismo de transmissão da LEB é pela via horizontal, por transmissão iatrogênica, através de procedimentos que permitam a transferência de sangue contaminado entre os animais (FLORES, 2007; DIMMOCK et al., 1991). Atividades práticas como: utilização de seringas hipodérmicas, luvas de palpação retal, administração de medicamentos, uso de material cirúrgico e aplicação de

vacinas, são procedimentos de responsabilidade técnica do médico veterinário, e por isso, o cuidado com esse material é fator imprescindível na profilaxia da doença. Assim como no presente estudo, Pinheiro-Junior et al. (2013), também identificaram associação significativa ($p < 0,000$) da variável assistência técnica com a ocorrência da leucose em rebanhos bovinos no estado de Alagoas. Segundo os autores, a interferência do médico veterinário sem os devidos cuidados higiênico sanitários pode ser um fator que esteja contribuindo para a disseminação da infecção nos rebanhos avaliados.

A associação da LEB com a variável moscas hematófagas não foi possível ser estatisticamente avaliada, isso porque em todos os rebanhos avaliados foi relatado pelos produtores a presença desses insetos. É evidente a contribuição dos mesmos na transmissão da doença. A participação de insetos hematófagos, especificamente os tabanídeos é relevante na disseminação do VLB, especialmente em regiões com altas infestações, maior proximidade entre animais e altas temperaturas, por possibilitar maior proliferação do vetor (LEUZZI JUNIOR; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Segundo Leuzzi Júnior et al. (2001), em decorrência da alternância alimentar em diferentes hospedeiros acredita-se que estes insetos desempenhem papel importante na propagação da doença.

Conclusão

Considerando a detecção de 20% de focos da PTB, identificados pela primeira vez na região estudada, e o elevado número de rebanhos com LEB (85%), nota-se a importância da implementação de medidas higiênico-sanitárias específicas incorporando os elementos de vigilância com base nos riscos identificados no estudo. Além disso, a orientação aos produtores sobre os prejuízos econômicos que tais doenças podem causar, deve ser utilizada como incentivo para a promoção de uma mudança de comportamento para melhoria na implementação de medidas eficazes de controle nos rebanhos.

Referências

- ABREU, V. L. V.; SILVA, J. A.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina nos Estados de Rondônia e Acre. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 42, n. 3, p. 203-2010, 1990.
- ACYPRESTE, C. S.; JULIANO, R. S.; RIVEIRA, F. E. B.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; DIAS-FILHO, F. C. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-

Mycobacterium paratuberculosis em vacas em lactação. *Ciência Animal Brasileira*. Goiânia, v. 6, n. 1, p. 55-59, 2005.

AMBRÓSIO, N. A. Intercorrência da leucose enzoótica bovina e mastite em vacas leiteiras naturalmente infectadas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

BARROS FILHO, I. R.; GUIMARÃES, A. K.; SPONCHIADO, D.; KRÜGER, E. R.; WAMMES, E. V.; OLLHOFF, R. D.; DORNBUSCH, P. T.; BIONDO, A. W. Soroprevalência de anticorpos para o vírus de Leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 511-515, 2010.

BARROSO, M. C. M. Inquérito soroepidemiológico da Leucose enzootica bovina nos bovinos de corte e de leite do município de Catalão, Goiás e correlação com os fatores predisponentes. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.15, n.4, p.93-99, 1995.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; DIAS, W. M. C.; SOUZA, R. M.; POGLIANI, F. C.; BIRGEL, D. B.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em animais da raça Simental, criados no Estado de São Paulo. *ARS Veterinária*, Jaboticabal, v.22, n.2, p.122-129, 2006.

BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; SCHUCH, L. F.; HALFEN, D.C. Infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.28, n.1, p.163-172, 1998.

CAMARGOS, M. F.; REIS, J. K. P.; LEITE, R.C. Bovine Leukemia Virus. *Virus Reviews & Research*, v. 9 n. 1, p. 44-59, 2004.

CARNEIRO, P. A. M.; ARAÚJO, P. W.; BIRGEL, E. H.; SOUSA, K. W. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas. *Acta Amazônia*, v. 33, p. 111-125, 2003.

CHIODINI, R. J.; VAN KRUININGEN, H. J.; MERKAL, R. S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Veterinary*, v. 74, p. 218-262, 1984.

COLLINS, M.T. "Diagnosis of paratuberculosis," *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v. 27, n. 3, p. 581-591, 2011.

CORDEIRO, J. L. F.; DESCHAMPS, F. C.; MARTINS, E.; MARTINS, V. M. V. Identificação e controle da leucose enzoótica bovina (LEB) em um rebanho leiteiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 8, p.1287-1292, 1994.

COSTA, J. C. M.; PIERI, F. A.; SOUZA, C. F.; ESPESCHIT, I. F.; FELIPPE, A. G.; SANTOS, G. M.; TOBIA, F. L.; SILVA-JUNIOR, A.; MOREIRA, M. A.S.. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, n.6, p.1491-1494, 2010.

DEL FAVA, C.; PITUCO E. M. Infecção pelo Vírus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. *O Biológico*, São Paulo, v.66, n.1/2, p.1-8, 2004.

- DIGIACOMO, R. The epidemiology and control of Bovine Leukemia Virus. *Veterinary Medicine*, v.87, p.248-257, 1992.
- DIMMOCK, C. K.; CHUNG, Y. S.; MACKENZIE, A. R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukemia virus infection in Queensland dairy herds. *Australian Veterinary Journal*, v. 68, n.7, p.230-233, 1991.
- DORÉ, E.; PARÉ, J.; CÔTÉ, G.; BUCZINSKI, S.; LABRECQUE, O.; ROY, J. P.; FECTEAU, G. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 26, n.1, p. 32-45, 2012.
- DOMENECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L.; JESÚS PAYÁ, M.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCÍA, E. *In vitro* infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *Journal of General Virology*, v. 81, n.1, p. 109-118, 2000.
- EMANUELSON, N.; SCHERLING, K.; PETTERSSON, H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 12, n.1-2, p.121-131, 1992.
- FECTEAU, M. E. Paratuberculosis in cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practise*, 2017.
- FECTEAU, M. E.; WHITLOCK, R. H.; BUERGELT, C. D.; Sweeney, R. W. Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. *Canadian Veterinary Journal*. v. 51, n.2, p.198–200, 2010;
- FERNÁNDEZ-SILVA, J. A.; CORREA-VALENCIA, N. M.; RAMÍREZ, N. F. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Tropical animal health and production*. v. 46, n. 8, p.1321–1340, 2014.
- FONSECA, L. F. L.; OLIVAL, A. A.; PEREIRA, C. C.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; SANTOS, M. V. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 28, p.51–56, 2000.
- FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. 1ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 888p. 2007.
- GARCIA, A B.; SHALLOO, L. The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n.8, p.5019-39, 2015.
- GONDA, M.G.; CHANG, Y. M.; SHOOK, G. E.; COLLINS, M. T.; KIRKPATRICK, B. W. Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holstein. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v.80, n. 2–3, p.103– 109, 2007.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Ranking quantidade de leite produzida no Brasil em 2016. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pa/brasil-novo/pesquisa/18/0?tipo=ranking&indicador=16559&localidade1=0&localidade2=313750>
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Produção da Pecuária Municipal 2015. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Disponível em <http://www.cidades.ibge.gov.br>

- JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; ELSNER, W. M.; BRITO, D.; ABREU, U. G. P.; SOUZA, S. N. Soroepidemiologia da leucemia bovina (LEB) em bovinos curraleiros dos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v.15, n.3, p.289-295, 2014.
- KOBAYASHI, S.; HIDANO, A.; TSUTSUI, T.; YAMAMOTO, T.; HAYAMA, Y.; NISHIDA, T.; MUROGA, N.; KONISHI, M.; KAMEYAMA, K.; MURAKAMI, K. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: a nationwide survey,” *Research in Veterinary Science*, v.96, n.1, p.47–53, 2014.
- MARCÉ, C.; EZANNO, P.; SEEGER, H.; PFEIFFER, D.U.; FOURICHON, C.; Within-herd contact structure and transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a persistently infected dairy cattle herd. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 100, p.116–125, 2011.
- McNAB, W. B.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W.; DUNCAN, J.R. Associations between lipoarabinomannan enzyme-immuno-assay test results for paratuberculosis and farm-management factors. *Preventive Veterinary Medicine*. Amsterdam, v.13, n.1, p.39–51, 1992.
- MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. T.; SILVA, A. O. A.; VALE, W. G. Ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no Estado do Pará, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.19, n.1, p.7-11, 1999.
- MORAES, M. P.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; OLIVEIRA, J. C. D.; REBELATTO, M. C.; ZANINI, M.; RABUSKE, M.; HÜBNER, S. O.; PEREIRA, N. M. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. v. 26, n. 2, p.257-262, 1996.
- NIELSEN, S. S.; BJERRE, H.; TOFT, N. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.91, p.4610–4615, 2008.
- PINHEIRO-JUNIOR, J. W.; SOUZA, M. E.; PORTO, W. J. N.; LIRA, N. S. C.; MOTA, R. A. Epidemiologia da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (LEB). *Ciência Animal Brasileira*. v.14, n.2, p. 258-264, 2013.
- RAJÃO, D. S.; HEINEMANN, M. B.; REIS, J. K. P.; BRAZ, G. F.; HADDAD, J. P. A.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LEITE, R. C. Efeito da Infecção pelo vírus da leucose bovina na produção de rebanhos leiteiros mestiços e puros no Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 35, n. 2, p. 891-900, 2014.
- RIDGE, S.E.; BAKER, I.M.; HANNAH, M. Effect of compliance with recommended calf-rearing practices on control of bovine Johne’s disease. *Australian Veterinary Journal*, v.83, p.85–90, 2005.
- RIDGE, S E.; HEUER, C.; COGGER, N.; HECK, A.; MOOR, S.; BAKER, I. M.; VAUGHAN, S. Herd management practices and the transmission of Johne’s disease within infected dairy herds in Victoria, Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v.95, n. 3-4, p.186–197, 2010.
- ROSSITER, C. A.; BURHANS W. Farm specific approach to paratuberculosis (Johne’s disease) control. *Veterinary Clinics: Food Animal Practise*, v.12, p.383–415, 1996.
- SÁ, L. M.; OLIVEIRA, J. M. B.; SANTOS, G. R.; BRANDESPIM, D. F.; SILVA-JÚNIOR, J. L.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Avaliação sorológica e de fatores de risco para a infecção por *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* em rebanhos leiteiros da

microrregião de Garanhuns, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.33, p.310–313, 2013.

SILVA, R. C.; FONTANA, I.; MEIRELLES, F. C.; RUGGIERO, A. P. M.; BENATO, N.; BORGES, J. R. J. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na forma de linfossarcomas no Distrito Federal: relato de caso. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.75, n.4, p.507-512, 2008.

STARLING, R. Z. C.; BEZERRE, A. O.; SALARDANE, I.; FERREIRA, P. G.; CLIPES, R. C.; DONATELI, D. N. Soroepidemiologia da leucose enzoótica bovina em propriedades leiteiras do município de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, Rio de Janeiro, v.6, n.12, p.427-441, 2013.

SWEENEY, R.W.; COLLINS, M. T.; KOETS, A. P.; McGUIRK, S. M.; ROUSSEL, A. J. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary Internal medicine*, v.26, n.6, p.1239-50, 2012.

SHETTIGARA, P. T.; SAMAGH, B. S.; LOBINOWICH, E.M. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel imunodifusion test. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.50, n.2, p.221-226, 1986.

SUN, W. W.; L.V, W.F; CONG, W; MENG, Q.F; WANG, C.F; SHAN, X. F; QIAN, A. D. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Bovine Leukemia Virus Seroprevalence and Associated Risk Factors in Commercial Dairy and Beef Cattle in Northern and Northeastern China. *Biomed Research International*, v.2015, p.1-7, 2015.

THRUSFIELD, M .V. *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. Roca, São Paulo. 2004.

VILAR, A. L.; SANTOS, C. S.; PIMENTA, C.L; FREITAS, T. D.; BRASIL, A. W.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; BEZERRA, C. S.; RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, T. S.; AZEVEDO, S. S. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v.121, n.1-2, p.49-55, 2015.

WHITTIER, D. Programs can rid herds of bovine leukosis. *Hoard's Dairyman*, v. 138, n. 8, p. 405, 1990.

WHITTINGTON, R.J.; MARSHALL, D.J.; NICHOLLS, P.J.; MARSH, I.B.; REDDACLIFF, L. A.; Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.5, p.2989–3004, 2004.

WHITTINGTON, R. J.; WINDSOR, P. A. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Veterinary Journal*, v.179, n.1, p. 60–9, 2009.

WINDSOR, P. A.; WHITTINGTON, R. J.; Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Veterinary Journal*, v.184, n. 1, p.37–4, 2010.

YAMASAKI, E. M.; TOKARNIA, C. H.; GALVÃO, A.; GOMES, M. J. P.; CHIES, J. A. B.; VEIT, T. D.; ARAGÃO, A. P.; BRITO, M. F. Aspectos clínicos-patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.30, n.11, p.921-932, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à importância da Tuberculose, Paratuberculose e Leucose Enzoótica Bovina no cenário econômico e de saúde pública, os resultados apresentados nessa Tese colaboram com a Defesa Agropecuária do Brasil, pois informa a situação epidemiológica dessas doenças que causam tantos prejuízos a produção de bovinos de leite. Além disso, demonstra aspectos relevantes no tocante aos métodos de diagnóstico empregados no controle da Tuberculose e possíveis interferências no exame de tuberculinização causada pela infecção concomitante de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Foram também identificados os principais fatores de risco associados à Paratuberculose e Leucose Enzoótica Bovina nos rebanhos leiteiros da região oeste de Minas Gerais.

Desde a implantação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCBET) em 2001, nota-se que em Minas Gerais, avanços no controle da tuberculose bovina ocorreram, sendo esses identificados tanto pela diminuição do nível de prevalência em rebanhos e animais, quanto pelo crescente número de propriedades que realizaram a certificação de rebanho livre para a doença. Porém, ainda há muito que se fazer. A situação da tuberculose bovina é bastante heterogênea no país, e a erradicação depende da maior rotina de exames de tuberculinização e eutanásia imediata de animais reagentes. Para que isso ocorra, acredita-se que seja fundamental a melhor interação entre equipes de Defesa Agropecuária, Inspeção Sanitária, médicos veterinários e produtores rurais. Nota-se também a necessidade do trabalho em conjunto para busca de uma possível indenização aos produtores que concordam com o sacrifício de animais reagentes positivos. Muitas vezes o produtor rural fica isolado e sem informações sobre como proceder e o médico veterinário como “traidor” do produtor rural. Além disso, o controle por meio da solicitação de exames de animais que vão para abate e a real obrigatoriedade de exames para os animais procedentes de rebanhos que comercializam leite, poderia contribuir muito no controle da doença.

A utilização de exames complementares ao diagnóstico de tuberculinização é fundamental para o alcance de uma informação eficaz e completa. O diagnóstico sorológico surge como ferramenta importante para auxiliar na identificação de animais infectados, porém que não reagem quando avaliados no diagnóstico alérgico cutâneo. A baixa associação entre os bovinos positivos no ELISA de tuberculose e os resultados obtidos nos exames de necropsia, histológico e microbiológico, sugere que ele precisa ser melhorado. A identificação de antígenos adaptados a realidade local e às condições naturais de infecção precisam ser melhores investigadas.

Diante a posição de destaque do estado de Minas Gerais na produção leiteira do país e dos prejuízos econômicos que a Leucose Enzoótica Bovina provoca nos rebanhos, faz-se necessária maior atenção por parte dos médicos veterinários, produtores e autoridades oficiais, no controle da doença. Caso não haja mudanças no manejo dos rebanhos, com a implantação de medidas higiênico-sanitárias específicas, acredita-se que a situação da doença irá cada vez mais piorar. É necessário um trabalho de conscientização tanto dos produtores quanto dos médicos veterinários, para os principais fatores relacionados à disseminação da doença nos rebanhos.

A falta de um programa oficial de controle da Paratuberculose bovina pode estar contribuindo para a disseminação da doença no Brasil. É crescente o número de estudos que demonstram a ocorrência da doença no rebanho bovino do país e, ainda, seus possíveis impactos na saúde pública. Pode ser que o diagnóstico da doença esteja sendo negligenciado. A não obrigatoriedade de exames de diagnóstico para trânsito e comercialização de animais e o desconhecimento da doença por parte de muitos proprietários e médicos veterinários, faz com que a doença seja sub-diagnosticada e sub-notificada. Ainda que haja suspeita da doença, o médico veterinário agora estará diante de dois desafios: a falta de uma rede de laboratórios habilitados que realizem o diagnóstico da doença e um sistema deficiente de transporte de amostras. Tais desafios foram vivenciados neste estudo, buscou-se vários laboratórios que realizassem o exame microbiológico do MAP e, quando isso foi possível, a empresa de transporte em greve prejudicou muito a qualidade do material que havia sido enviado para análise.

Passamos por crise econômica no Brasil, e para realização desta pesquisa foi fundamental a parceria estabelecida com outras Instituições de ensino e pesquisa, como Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Instituto Biológico e MAPA-LANAGRO/Pedro Leopoldo. Parte dessa pesquisa, que seria realizada em colaboração com o Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) da Argentina, só foi possível de ser concluída a poucos dias da entrega do trabalho final, por isso mesmo, infelizmente não foi possível incluir os resultados de genotipagem de *M. bovis*. Para que pudéssemos obter a liberação de transporte de amostras biológicas para a Argentina, uma série de documentos nos foram exigidos, tanto por parte do governo brasileiro, quanto do país importador. Após meses reunindo tais documentos, e estes terem sido aprovados, fizemos o envio das amostras por empresa de transporte de encomendas. Sem explicações claras, as amostras ficaram retidas por três meses na alfândega, até que foram devolvidas para o Brasil. Não desistimos, mais uma vez nos reunimos com fiscais do MAPA, atualizamos a documentação e enviamos novamente. Foram mais cinco meses de retenção das amostras na alfândega, até a liberação. Sabemos da importância e cuidados necessários para entrada e saída de material biológico de um país, por isso mesmo todos os cuidados e documentação solicitados foram atendidos. Necessitamos urgentemente de mais apoio e atenção para a pesquisa científica, além de informações em situações como esta.