

**Reações falso-negativas ao teste cervical comparativo para tuberculose bovina**





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Corte  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 38***

**Reações falso-negativas ao  
teste cervical comparativo para  
tuberculose bovina**

*Rudielle A. Rodrigues<sup>1</sup>  
Ingrid I.F.S. Meneses<sup>2</sup>  
Klaudia S.G. Jorge<sup>1</sup>  
Gisele O.C. Leguizamón<sup>3</sup>  
Márcio R. Silva<sup>4</sup>  
Carlos A. N. Ramos<sup>1</sup>  
Lenita R. Santos<sup>3</sup>  
Walter Lilenbaum<sup>5</sup>  
Rodrigo N. Etges<sup>6</sup>  
Flávio R. Araújo<sup>3\*</sup>*

Embrapa  
Brasília, DF  
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Corte**

Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS, 79106-550

Fone: (67) 3368 2000

Fax: (67) 3368 2150

<http://www.embrapa.br/gado-de-corte>

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Ronney Robson Mamede*

Secretário-Executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros: *Alexandre Romeiro de Araújo, André Dominghetti Ferreira, Andréa Alves do Egito, Kadijah Suleiman Jaghub, Liana Jank, Lucimara Chiari, Marcelo Castro Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Rodiney de Arruda Mauro, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Foto da capa:

**1ª edição**

Versão online (2017)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Gado de Corte.**

---

Reações falso-negativas ao teste cervical comparativo para tuberculose bovina [recurso eletrônico] / Rudielle A. Rodrigues... [et al]. – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2017.

30 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 38).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/bp/BP38.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 7 de julho de 2017).

Outros autores: Ingrid I. F. S. Meneses; Klaudia S. G. Jorge; Gisele O. C. Leguizamón; Márcio R. Silva; Carlos A. N. Ramos; Lenita R. Santos; Walter Lilienbaum; Rodrigo N. Etges; Flávio R. Araújo.

1. Tuberculose bovina. 2. Teste cervical. 3. *Mycobacterium bovis*. 4. Cultura. I. Série. II. Embrapa Gado de Corte.

---

CDD 633.2

© Embrapa Gado de Corte 2016

# Sumário



# Reações falso-negativas ao teste cervical comparativo para tuberculose bovina

*Rudielle A. Rodrigues<sup>1</sup>; Ingrid I. F. S. Meneses<sup>2</sup>; Klaudia S. G. Jorge<sup>1</sup>; Gisele O. C. Leguizamón<sup>3</sup>; Márcio R. Silva<sup>4</sup>; Carlos A. N. Ramos<sup>1</sup>; Lenita R. Santos<sup>3</sup>; Walter Lilenbaum<sup>5</sup>; Rodrigo N. Etges<sup>6</sup>; Flávio R. Araújo<sup>3\*</sup>*

## Resumo

No Brasil, segundo o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os testes de rotina para o diagnóstico de tuberculose bovina são o teste cervical simples (TCC), o teste da prega caudal (TPC) e o teste cervical comparativo (TCC), sendo que o último também é utilizado como teste confirmatório. Um grupo de 53 animais oriundos de três rebanhos leiteiros de área de foco para tuberculose bovina que foram submetidos a vazio sanitário no Rio Grande do Sul foi submetido ao TCC. Os tecidos destes animais foram

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Senador Filinto Muler, n. 2443, Cidade Universitária, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Costa e Silva, S/N, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Imunologia, Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, n. 830, Zona Rural, CEP 70106-550, Campo Grande, MS, Brasil. \*Autor para correspondência: flabio.araujo@embrapa.br.

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, n. 610, Dom Bosco, CEP 36038-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Hernani Mello, n.101, Niterói, RJ, Brasil.

<sup>6</sup>Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação, Avenida Getúlio Vargas, n. 1384, Menino Deus, CEP 90150-004, Porto Alegre, RS, Brasil.

cultivados e as colônias resultantes confirmadas por PCR e sequenciamento de DNA. Dos 53 animais analisados no TCC, 32 (60,4%) foram negativos, 14 (26,4%) positivos e sete (13,2%) inconclusivos, com base no PNCEBT. O TCC detectou como positivos 11 dos 39 animais com infecção por *M. bovis* confirmada por cultivo. Do total de 14 animais não infectados, baseado na cultura, o TCC detectou oito como negativos. Assim, o TCC apresentou, para a população amostrada, sensibilidade de 28,2% e especificidade de 57,1%. Um total de 24/32 (75,0%) dos animais negativos ao TCC foi positivo no cultivo (confirmado por PCR), sendo considerados falso-negativos ao TCC. A manutenção destes animais falso-negativos nos rebanhos tem sérias implicações para o controle da enfermidade, já que os mesmos podem ser fonte de infecção. A adição de testes complementares poderia auxiliar na identificação destes animais, aumentando a cobertura diagnóstica.

**Termos para indexação:** *Mycobacterium bovis*; Teste Cervical Comparativo; cultura bacteriológica, PCR.

# ***False-negative Reactions to the Comparative Intradermal Tuberculin Test for Bovine Tuberculosis***

*Rudielle A. Rodrigues<sup>1</sup>; Ingrid I. F. S. Meneses<sup>2</sup>; Klaudia S. G. Jorge<sup>1</sup>; Gisele O. C. Leguizamón<sup>3</sup>; Márcio R. Silva<sup>4</sup>; Carlos A. N. Ramos<sup>1</sup>; Lenita R. Santos<sup>3</sup>; Walter Lilienbaum<sup>5</sup>; Rodrigo N. Etges<sup>6</sup>; Flávio R. Araújo<sup>3\*</sup>*

## **Abstract**

*In Brazil, according to the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), the routine tests for the diagnosis of bovine tuberculosis (bTB) are the simple intradermal tuberculin test (SITT), the caudal fold test (CFT) and the comparative intradermal tuberculin test (CITT). The latter is also used as a confirmatory test. A group of 53 animals from three dairy herds of an outbreak area for bTB that were submitted to depopulation in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, were submitted to CITT. The tissues of these animals were cultured and the resulting colonies confirmed by PCR and DNA sequencing. Of the 53 animals analyzed in the CITT, 32 (60.4%) were negative, 14 (26.4%) positive and seven (13.2%) inconclusive. The CITT detected 11 out of the 39 animals with culture-confirmed *M. bovis* infection as positive. From the total of 14 uninfected animals, based on culture, the CITT detected eight as negative. Thus, the CITT showed a sensitivity of 28.2% and a specificity of 57.1% for the sampled population. A total of 24/32 (75.0%) of the animals negative to CITT were culture positive (confirmed by PCR) and were considered false negative. The maintenance of these false-negative animals in the herds has serious implications for the control of the disease, since they can be a source of infection.*

*The addition of complementary tests could help to identify these animals, increasing the diagnostic coverage.*

***Index terms:*** *Mycobacterium bovis; Comparative Intradermal Tuberculin Test; bacteriological culture, PCR.*

## Introdução

A tuberculose bovina (TB) é uma enfermidade infecciosa de evolução crônica, causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium bovis*, que acomete muitas espécies domésticas e silvestres, principalmente bovinos e bubalinos, além de causar doença em humanos (PESCIAROLI et al., 2014). A doença representa uma ameaça à saúde pública e causa perdas econômicas à pecuária, principalmente devido à eliminação dos bovinos infectados (SA'IDU et al., 2015). Além disso, a presença da doença nos rebanhos implica em barreira comercial à exportação de carne (BRASIL, 2012).

Em vários países, os programas de controle da tuberculose bovina se baseiam em identificar e remover os animais infectados. Para tal, utilizam-se principalmente do teste intradérmico, que se baseia na avaliação da hipersensibilidade tardia após a inoculação de antígeno micobacteriano, denominado derivado proteico purificado (PPD). Ainda que o teste intradérmico seja o método padrão recomendado para o diagnóstico de animais infectados com *M. bovis* (OIE, 2015), são bem conhecidas suas limitações quanto à especificidade devido a reações cruzadas com espécies de micobactérias não tuberculosas (CHEN et al., 2014) ou quanto à sensibilidade, pela presença de animais em estágio avançado da doença, os quais tornam-se anérgicos (WHELAN et al., 2011). Diante disso, é consenso que o teste intradérmico isoladamente pode não ser capaz de detectar todos os animais infectados com *M. bovis*, ocorrendo resultados falso-negativos no diagnóstico (CASAL et al., 2014; MOSAVARI et al., 2016).

Apesar do sucesso de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina em diversas partes do mundo, ainda são frequentes os relatos de persistência de focos da doença após a implantação de programas de controle. Essa dificuldade pode se dever à reintrodução de bovinos infectados nos rebanhos, transmissão por animais silvestres/asselvajados, ou principalmente por falha na detecção de todos os animais infectados, os quais podem permanecer como reservatórios da TB e contaminar os demais animais (CONLAN et al., 2012; MOSAVARI et al., 2016).

No Brasil, segundo o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os testes recomendados para o diagnóstico de tuberculose bovina são o teste cervical simples (TCC), o teste da prega caudal (TPC) e o teste cervical comparativo (TCC), sendo que o último também é utilizado como teste confirmatório. Preconiza-se que os animais que apresentem uma diferença dos aumentos da dobra da pele, provocados pela inoculação da PPD de *M. bovis* e da PPD de *M. avium*, igual ou superior a 4 mm (PPD de *M. bovis* - PPD de *M. avium*), sejam considerados positivos para tuberculose (Brasil 2016). É bem conhecida a reação cruzada com micobactérias ambientais, as quais podem sensibilizar o animal e torná-lo positivo ao teste intradérmico, mesmo na ausência de infecção tuberculosa. Desta forma, assume-se ainda que a avaliação pareada das reações à PPD de *M. bovis* e PPD de *M. avium* aumentaria a especificidade do TCC, reduzindo a ocorrência de tais reações falso-positivas (BRASIL, 2006).

Apesar de mais específico, o TCC pode também apresentar problemas de baixa sensibilidade, não sendo capaz de identificar animais verdadeiramente infectados (WHELAN et al., 2011). No presente estudo demonstrou-se a ocorrência de reações falso-negativas ao TCC em rebanhos leiteiros infectados. A ocorrência da infecção foi verificada por meio do cultivo bacteriológico de lesões sugestivas de tuberculose, seguida de PCR e sequenciamento de DNA das colônias resultantes. Foram discutidos os impactos dos achados sobre o PNCEBT.

## Material e métodos

### Desenho do Estudo

O estudo foi realizado entre os meses de dezembro de 2014 até março de 2015, com três rebanhos de bovinos dos municípios de Arroio do Meio e Bom Retiro do Sul, da microrregião Lajeado-Estrela, Rio Grande

do Sul (Figura 1), que têm como exploração principal a pecuária leiteira. Um total de 53 animais de três rebanhos foi estudado, todos da raça holandesa e mantidos em sistema de criação semi-intensivo. Independentemente de seus resultados ao teste intradérmico, todos os animais foram abatidos e necropsiados, seguindo a determinação do Serviço Veterinário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul de realizar vazio sanitário, tendo fragmentos de tecidos e linfonodos cultivados para micobactérias. Colônias sugestivas de *M. bovis* foram confirmadas por PCR e sequenciamento de DNA.



Fig.1. Microrregião Lajeado-Estrela, do Estado do Rio Grande do Sul.

## Rebanhos e animais

Dois dos três rebanhos estudados detinham certificação de estabelecimento de criação livre de tuberculose, sendo o rebanho A desde 2010 e B, desde 2013. O rebanho C não era certificado. Em 2014, o teste intradérmico rotineiro resultou na detecção de animais positivos nos três rebanhos, os quais foram abatidos. No ano de 2015, os três rebanhos sofreram vazio sanitário, na ocasião 38 animais do rebanho A, sete animais do rebanho B e oito animais do rebanho C, totalizando 53 animais.

## Teste intradérmico

O Teste Cervical Comparativo (TCC) foi realizado segundo as normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT (Brasil 2016) O teste constou da injeção de 0,1 mL de PPD de *M. bovis* (bovPPD) e PPD de *M. avium* (avPPD) por via intradérmica, mantendo uma distância de 15 a 20 cm entre ambas as inoculações; sendo o avPPD inoculado cranialmente ao bovPPD no terço médio da região cervical. A leitura foi conduzida após 72 horas com um cutímetro, com base na avaliação da reação de hipersensibilidade no local da inoculação. O animal foi considerado positivo quando a reação ao bovPPD foi maior que 4,0 mm comparado com a reação ao avPPD. A notificação dos bovinos reagentes também foi realizada conforme as instruções do PNCEBT, para as Inspetorias de Defesa Agropecuária, que são, no Rio Grande do Sul, as Unidades Locais de Atendimento Veterinário.

## Amostras

Todos os animais dos rebanhos infectados foram abatidos e necropsiados. Os abates dos animais foram realizados sob a supervisão do serviço de inspeção veterinária, sendo coletados fragmentos de tecidos de pulmão e glândula mamária, e linfonodos inteiros retrofaríngeos, intramamários, pulmonares e mesentéricos com ou sem lesões macroscópicas compatíveis com tuberculose, de todos os animais. Na ausência de lesões sugestivas de tuberculose, foram colhidos linfonodos hepáticos, mediastínicos, mesentéricos, retrofaríngeos e traqueobrônquicos. As amostras de tecidos foram coletadas e acondicionadas separadamente em sacos plásticos vedados, indicando o número do animal e o nome do órgão coletado. Em seguida, foram imediatamente acondicionados em frascos tampa de rosca, incluindo em cada um deles de dois a três conjuntos de tecidos, indicando no frasco os números dos animais de origem das frações dos órgãos coletados. Imediatamente após a coleta, as amostras foram congeladas para posterior remessa, sob refrigeração, em caixa isolante térmica, que foi inserida em caixa de papelão,

indicando tratar-se de material infectante, cumprindo as normas determinadas pela Instrução de Embalagem P/650-IATA (*International Air Transport Association*).

### **Cultivo e identificação de *Mycobacterium bovis***

As amostras de tecidos foram mantidas congeladas a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem processadas. Para o processamento dos tecidos, foram macerados fragmentos de tecidos perimetrais (entre 10 e 25 mg) com 1,5 mL de água destilada estéril em aparelho *Magna Lyser* (Roche Life Science), submetidas à descontaminação por método de Petroff (Makovcova et al. 2015) e cultivadas em meio de cultivo *Stonebrink*, incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e avaliadas durante 90 dias. As colônias sugestivas de *M. bovis* foram submetidas a PCR convencional com os iniciadores Mb.400, que amplificam um fragmento de 400 pares de bases (pb) que flanqueia a região de diferenciação 4 (RD4), ausente nesta espécie, porém presente em todos os demais membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* - CMT (SALES et al., 2014).

### **Purificação dos produtos da PCR**

Os produtos das amplificações foram purificados em um volume total de reação de 10 uL cada, com 0,5 UI da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e 0,05 UI da enzima Exonuclease I (EXO) e incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, seguido de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos em termociclador MJ Mini (Biorad).

### **Sequenciamento de DNA**

A reação de sequenciamento foi realizada com o *kit BigDye Terminator cycle sequencing* (versão 3.1, *Applied biosystems*, Foster city, CA, USA), em um volume total de reação de 10 uL, nas seguintes propor-

ções: 1 uL de DNA (50 ng/uL); 5,8 uL de água ultrapura tipo 1; 2 uL de tampão; 0,5 uL de iniciador Mb.400R (5 mM) e 0,7 uL de *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix*. As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Mini (Biorad), utilizando o seguinte programa: 96 °C por 1 min., seguido por 25 ciclos de 96 °C por 10 seg., 50 °C por 5 seg. e 60 °C por 4 min. Em seguida, foi realizada uma etapa de purificação com EDTA (125 mM, pH 8,0), etanol 70% e etanol absoluto. Os produtos da PCR purificados foram sequenciados em um sequenciador automático modelo ABI-3130 (*Applied Biosystems*, USA).

### **Alinhamento local de sequências de DNA**

O *base calling* das sequências de DNA foi realizado com o programa *Sequence Scanner (Applied Biosystems)* e as sequências resultantes foram submetidas à busca de identidade pelo Blastn (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **Análise estatística**

O grau de concordância entre cada dois testes foi avaliado de forma pareada pelo Teste de McNemar ou Teste exato de Fisher, os quais determinam se proporções pareadas são ou não diferentes. Foram considerados discordantes quando o teste apresentava valor de  $p \leq 0,05$ . O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para medir o grau de correlação linear entre as duas medidas obtidas pareadas por animal: PPD de *M. bovis* e de *M. avium*. Foi gerada uma estimativa gráfica (curva de regressão) a partir dos pares de leituras (PPD de *M. bovis* e de *M. avium*) observados.

## **Resultados**

O TCC dos 53 animais detectou 14 (26,4%) animais positivos e sete (13,2%) inconclusivos. Ao abate, foram evidenciadas lesões sugestivas de tuberculose (LST) em algum órgão/tecido de 43 animais, sendo

13/14 animais com TCC positivo (92,9%), 5/7 inconclusivos (71,4%) e 25/32 (78,1%) animais com TCC negativo (Tabela 1). Pelo teste McNemar, houve uma discordância significativa entre resultados de TCC e de presença de LST ( $p = 0,000006468$ ). Pelo *Odds Ratio* emparelhado, a chance de pares discordantes de animais positivos para LST e negativos para TCC foi de 25 vezes (IC95% 3,38-184,5) a chance de animais negativos para LST e positivos para TCC.

Dos 53 animais estudados, 39 (73,6%) se confirmaram como infectados por *M. bovis* pelo cultivo bacteriológico. Dos 43 animais cujos tecidos apresentaram LST, 39 (90,7%) foram positivos à cultura bacteriológica, enquanto todos os dez animais sem LST foram negativos. O TCC detectou como positivos 11 dos 39 animais com infecção por *M. bovis* confirmada por cultivo. Do total de 14 animais não infectados, baseado na cultura, o TCC detectou oito como negativos. Assim, o TCC apresentou, para a população amostrada, sensibilidade de 28,2% e especificidade de 57,1%. Um total de 24/32 (75,0%) dos animais negativos ao TCC foi positivo no cultivo (confirmado por PCR), sendo considerados falso-negativos ao TCC (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do Teste cervical comparativo (TCC), presença de lesões sugestivas de tuberculose e cultura bacteriológica de bovinos da microrregião Lajeado-Estrela, Rio Grande do Sul.

Resultado TCC	LST +/- cultivo +	LST +/- cultivo -	LST -/ cultivo +	LST -/ cultivo -	Total
TCC +	11	2	0	1	14
TCC -	24	1	0	7	32
TCC inc.	4	1	0	2	7
Total	39	4	0	10	53

Todas as colônias sugestivas foram confirmadas por PCR convencional para a RD4. Realizou-se sequenciamento do fragmento de DNA

que franqueia a RD4, resultante da PCR específica para *M. bovis*, em 12/24 animais que apresentaram cultivo positivo, porém TCC negativo. As sequências resultantes todas apresentaram como *best hit* o fragmento homólogo no isolado AF2122/97 de *M. bovis* (Sequence ID: LT708304), com identidades de 99 a 100%.

Pelo teste exato de Fisher, não houve diferença significativa entre a presença de LST e a ocorrência de cultivo positivo para *M. bovis* ( $p$  unicaudal = 0,12;  $p$  bicaudal = 0,25). A prevalência aparente da tuberculose bovina nos rebanhos deste estudo foi de 26,4%, com base no TCC. No entanto, a prevalência real, com base no cultivo confirmado por PCR, foi de 73,6%.

## Discussão

No Brasil, os únicos métodos preconizados pelo PNCEBT para diagnóstico *antemortem* da tuberculose bovina (TB) são os testes intradérmicos da prega caudal (TPC), cervical simples (TCS) e cervical comparativo (TCC). Na revisão do programa, este último teste, antes considerado confirmatório, utilizado em animais inconclusivos ao TCS e reagentes ao TPC (BRASIL, 2006), passou a ser considerado também como teste de rotina (BRASIL, 2016).

Sabe-se que a infecção por *M. bovis* desencadeia predominantemente uma resposta celular durante as fases iniciais e intermediárias da infecção, coordenada por linfócitos Th1. Dessa forma, os testes intradérmicos com PPD são baseados na detecção desta resposta celular (SCHILLER et al., 2010).

O TCS testa a resposta celular ao PPD de *M. bovis*, enquanto o TCC testa simultaneamente as reações intradérmicas ao PPD de *M. bovis* e PPD de *M. avium*. Sabe-se que as micobactérias ambientais podem interferir nos testes intradérmicos, por serem capazes de sensibilizar os animais, provocando reações inespecíficas ao PPD de *M. bovis* (ARA-

NAZ et al., 2006, AAGAARD et al., 2010), devido a alguns antígenos comuns (BIET E BOSCHIROLI, 2014). Desta forma, é esperado que o TCC apresente uma especificidade maior, quando comparado ao TCS, no diagnóstico da tuberculose bovina, justamente por detectar possíveis reações cruzadas às micobactérias ambientais. No que diz respeito à sua especificidade, a maior parte dos estudos que incluem abate e análise de fragmentos de tecidos revelam que o TCC apresenta adequada especificidade (> 90%), tendo sido estimada em uma revisão entre 96-99% do Reino Unido (MONAGHAN et al., 1994) e média de 98,6% nos EUA (FARNHAM et al., 2012). Assim, é consenso a utilidade do TCC como método confirmatório da infecção por *M. bovis*.

Enquanto a sua sensibilidade e seu uso como método de triagem, os resultados são bastante diversos e, muitas vezes, insatisfatórios. Em estudo realizado no Reino Unido, que incluiu exame *post-mortem* de todos os animais do rebanho, a sensibilidade do TCC foi de 81% (IC 70-89%) (KAROLEMEAS et al., 2012). A sensibilidade do TCC é frequentemente relatada como insatisfatória, com estimativas médias de 68-90% no Reino Unido (MONAGHAN et al., 1994) e média de 88,4% nos EUA (FARNHAM et al., 2012). Portanto, a utilidade do TCC como método de triagem para a infecção por *M. bovis* é questionável e deve ser recomendado com cautela.

Vazios sanitários, em que todo o rebanho sofre abate, após falha no controle da tuberculose bovina, são uma oportunidade singular de avaliar parâmetros de qualidade de testes intradérmicos, uma vez que são gerados dados de cultivo de animais positivos e negativos aos mesmos (KAROLEMEAS et al., 2012). Este estudo empregou esta estratégia, permitindo confrontar dados das reações intradérmicas a PPD e cultivo bacteriológico das LST, com confirmação molecular das amostras bacterianas obtidas.

No presente estudo, resultados de TCC divergiram significativamente da detecção de LST ao abate, uma vez que foram detectadas LST em vários animais com TCC negativo, caracterizando o resultado falso-ne-

gativo do TCC e sua incapacidade de detectar tais animais comprovadamente infectados. A detecção de LST não divergiu significativamente do cultivo para *M. bovis*, o que reforça a recomendação de que animais abatidos com suspeita de tuberculose bovina sejam sempre necropsiados e analisados cuidadosamente para a verificação de LST (ARAÚJO et al., 2014; EJEH et al., 2014). Não somente as LST geraram colônias sugestivas de *M. bovis*, como estas foram confirmadas por PCR, seguido por sequenciamento de DNA.

Apesar do baixo número de bovinos com resultados inconclusivos ao TCC, a maior parte deles apresentou LST e cultivos positivos para *M. bovis*, o que reforça a recomendação de que, em regiões de foco, animais inconclusivos podem evoluir para positivos com a progressão da doença e devem ser abatidos (ZARDEN et al., 2013).

Sem dúvida, o principal achado deste estudo foi que, dos 32 animais negativos ao TCC, 25 (78%) apresentaram LST e todos com exceção de um, foram confirmados por cultura bacteriológica, o método padrão de diagnóstico de tuberculose bovina. Este achado é surpreendente e alarmante, visto que se somente o TCC tivesse sido aplicado nestes rebanhos, tais animais teriam sido considerados negativos e manteriam a infecção no rebanho, disseminando-a para outros animais e para o homem. Adicionalmente, pode ocorrer a disseminação da tuberculose bovina para outras regiões, já que animais infectados podem ser comercializados com atestado negativo. Cabe ressaltar que dois dos três rebanhos examinados haviam sido certificados como livres de tuberculose bovina. Esta situação pode variar a depender da região estudada e desta forma, o TCC, embora continue representando uma excelente alternativa confirmatória em rebanhos acometidos de infecções por micobactérias ambientais, não se confirmou, nestes rebanhos estudados, como um adequado método de triagem para a tuberculose bovina.

Evidentemente, os achados para a população desse estudo não são necessariamente extrapoláveis para outras situações epidemiológicas. Recente estudo do nosso grupo evidenciou apenas 1/51 (1,9%) animal TCC negativo com cultivo positivo para *M. bovis* (ARAÚJO et al., 2014).

Mesmo durante um foco, uma vez que um bovino é classificado como negativo pelos testes intradérmicos, não há recomendação para testes adicionais. Dessa forma, tais animais frequentemente não são abatidos e a investigação adicional desses animais é prejudicada, pela dificuldade em obter amostras de animais vivos. Embora tentativas de diagnóstico direto em amostras de animais vivos tenham sido realizadas com secreção nasal (DE SOUZA FIGUEIREDO et al., 2010) e com leite (ZARDEN et al., 2013; BEZERRA et al., 2015), os resultados não são muito encorajadores, pela possibilidade dos animais apresentarem apenas lesões pulmonares fechadas ainda sem a presença do agente infeccioso nestes tecidos.

Sabe-se que a incapacidade de identificar todos os animais infectados prejudica o controle e erradicação da tuberculose bovina (LAHUERTA-MARIN et al., 2016). Neste estudo, a ocorrência de um alto percentual de reações falso-negativas ao TCC levou ao insucesso no controle dos surtos e a indicação de vazio sanitário. O uso paralelo de diferentes testes de diagnóstico *in vivo*, como a detecção de interferon-gama para a detecção da resposta mediada imune por células (MARASSI et al., 2010; LAHUERTA-MARIN et al., 2016) e de testes sorológicos como o ELISA para a detecção da resposta humoral (MARASSI et al., 2011; CASAL et al., 2014) pode aumentar a cobertura diagnóstica conferida pelos testes intradérmicos e diminuir o impacto das falhas de diagnóstico sobre o controle da tuberculose bovina (LAHUERTA-MARIN et al., 2016).

## Conclusão

O TCC apresentou baixa sensibilidade no diagnóstico da tuberculose bovina e um percentual elevado de animais com reações falso-negativas. A manutenção destes animais falso-negativos nos rebanhos tem sérias implicações para o controle da enfermidade, já que os mesmos podem ser fonte de infecção. A adição de testes complementares auxiliam na identificação destes animais, aumentando a cobertura diagnóstica, a higidez sanitária do rebanho e o controle da tuberculose bovina.

## Financiamento

Esta pesquisa foi financiada pela Embrapa (Código SEG: 02.13.10.008.00.00), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI/CNPQ/Universal (Processo: 443235/2014-7) e FUNDECT/CNPq (TO: 085/2015).

## Referências bibliográficas

AAGAARD, C. et al. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. **Preventive Veterinary Medicine** v. 96, n. 3-4, p.161-169, 2010.

ARANAZ, A. et al. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Research** v. 37, n. 4, p. 593-606, 2006.

ARAÚJO, C. P. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. **PLoS One** v. 9, n. 3, e91023, 2014.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, **Secretaria de Defesa Agropecuária** - Departamento de Saúde Animal p. 1-188, 2006.

BRASIL Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Norma Interna SDA 02/2012: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Secretaria de Defesa Agropecuária** p. 1-4, 2012.

BRASIL Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 19, de 10 de outubro de 2016. **Secretaria de Defesa Agropecuária** p. 1-4, 2016.

BEZERRA, A. V. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* Complexes by Real-Time PCR in Bovine Milk from Brazilian Dairy Farms. **Journal of Food Protection** v. 78, n. 5, p. 1037-1042, 2015.

BUDDLE, B. M. et al. Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in

domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. **New Zealand Veterinary Journal** v. 63, n. 1, p. 19-27, 2015.

CASAL, C. et al. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. **Veterinary Microbiology** v. 170, n. 3-4, p. 342-351, 2014.

CHEN, S. et al. New skin test for detection of bovine tuberculosis on the basis of antigen-displaying polyester inclusions produced by recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology** v. 80, n.8, p. 2526-2535, 2014.

CONLAN, A. J. et al. Estimating the hidden burden of bovine tuberculosis in Great Britain. **PLOS Computational Biology** v. 8, n. 10, e1002730, 2012.

DE SOUZA FIGUEIREDO, E. E. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex PCR. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 41, n. 2, p. 386-390, 2010.

EJEH, E. F. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* in slaughtered cattle in North-Central Nigeria and the public health implications. **African Journal of Medicine and Medical Sciences** v. 43, p. 97-104, 2014.

FARNHAM M. W. et al. Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine** v. 103, n. 2-3, p. 234-242, 2012.

KAROLEMEAS, K. et al. Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. **PLoS One** v. 7, n. 8, p. 1-7, 2012.

LAHUERTA-MARIN, A. et al. Risk factors for failure to detect bovine tuberculosis in cattle from infected herds across Northern Ireland (2004-2010). **Research in Veterinary Science** v. 107, p. 233-239, 2016.

MAKOVCOVA, J. et al. Comparison of methods for the isolation of mycobacteria from water treatment plant sludge. **Antonie Van Leeuwenhoek** v. 107, p. 1165-1179, 2015.

MARASSI, C. D. et al. The use of a Gamma-Interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. **Acta Tropica** v. 113, n. 2, p. 199-201, 2010.

MARASSI, C. D. et al. Use of recombinant proteins MPB70 or MPB83 as capture anti-

gens in ELISAs to confirm bovine tuberculosis infections in Brazil. **Acta Tropica** v. 118, n. 2, p. 101-104, 2011.

MONAGHAN, M. L. et al. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology** v. 40, n. 1-2, p. 111-124, 1994.

MOSAVARI N. et al. Mycobacterial coinfection and persisting bovine tuberculosis—Has the time arrived for a policy review?. **International Journal of Mycobacteriology** v. 5, n. 2016, p. S82–S83, 2016.

OIE **WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH**. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2016. chapter. 2.4.6, v. 1, p. 1-17, 2015. Disponível em <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.06\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BOVINE_TB.pdf)>. Acesso em 6 de maio de 2016.

PESCIAROLI, M. et al. Tuberculosis in domestic animal species. **Research in Veterinary Science** v. 97, p. S78-S85, 2014.

SALES, M. L. et al. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia Microbiol** v. 59, n.5, p. 433-438, 2014.

SA'IDU, A. S. et al. Public health implications and risk factors assessment of *Mycobacterium bovis* infections among abattoir personnel in Bauchi State, Nigeria. **Journal of Veterinary Medicine** v. 2015, p. 1-5, 2015.

SCHILLER, I. et al. 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, n. 4, p. 205-220, 2010.

TREWBY, H. et al. Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. **Epidemics** v. 14, n. 2016, p. 26–35, 2016.

WHELAN, C. et al. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v. 23, n. 3, p. 499-503, 2011.

ZARDEN, C. F. et al. *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. **Veterinary Record** v. 172, n. 5, p. 130, 2013.





---

*Gado de Corte*

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

**Governo  
Federal**

**CGPE 13856**