

LUIZ CARLOS FONTES BAPTISTA FILHO

**USO DO ELISA NO DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA LEUCOSE
ENZOÓTICA E DA TUBERCULOSE DOS BOVINOS**

**RECIFE
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

LUIZ CARLOS FONTES BAPTISTA FILHO

**USO DO ELISA NO DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA LEUCOSE
ENZOÓTICA E DA TUBERCULOSE DOS BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

**RECIFE
2016**

Ficha catalográfica

B222u Baptista Filho, Luiz Carlos Fontes

 Uso do ELISA no diagnóstico e controle da leucose enzoótica e da tuberculose dos bovinos / Luiz Carlos Fontes Baptista Filho. – Recife, 2016.

 92 f. : il.

 Orientador: Lúcio Esmeraldo Honório de Melo.

 Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2016.

 Inclui referências e apêndice(s).

 1. Sorodiagnóstico 2. Ruminantes 3. *Mycobacterium bovis*
 4. Vírus da leucose bovina I. Melo, Lúcio Esmeraldo Honório de, orientador II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

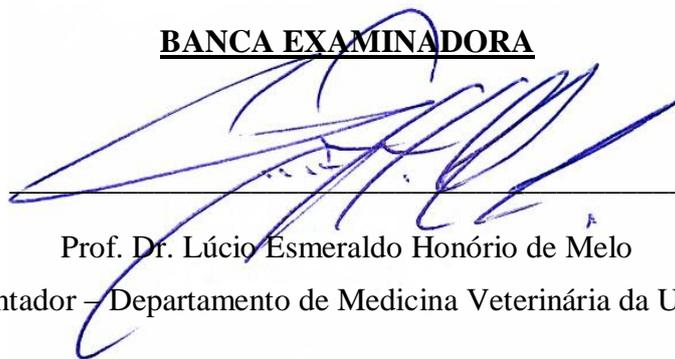
**USO DO ELISA NO DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA LEUCOSE
ENZOÓTICA E DA TUBERCULOSE DOS BOVINOS**

Tese de Doutorado elaborada por

LUIZ CARLOS FONTES BAPTISTA FILHO

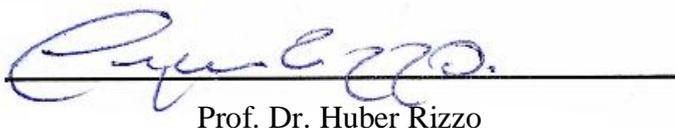
Aprovada em 16/02/2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



Prof. Dr. Huber Rizzo

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



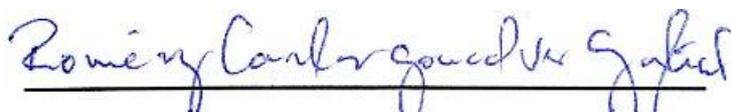
Profa. Dra. Rita de Cassia Carvalho Maia

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



Profa. Dra. Taciana Rabelo Ramalho Ramos

Unidade Acadêmica de Garanhuns / UFRPE



Prof. Dr. Roniery Carlos Gonçalves Galindo

Faculdade Pio Décimo / Sergipe

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, Luiz Carlos Fontes Baptista e Maria do Rosário de Fátima de Albuquerque Baptista, e para minha esposa, Susilene Nunes Vieira Baptista, que são meu intransponível alicerce e responsáveis por minhas conquistas.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela vida e família maravilhosa que me colocou e por me colocar nos caminhos da ciência.

À minha família, em especial meus pais, Luiz Carlos Fontes Baptista e Maria do Rosário de F. de Albuquerque Baptista, e irmãos Bruno de Albuquerque Baptista, Renata de Albuquerque Baptista e Rafael de Albuquerque Baptista, por todo apoio e preocupação durante toda minha escalada acadêmica.

À minha esposa, companheira de todas as jornadas e caminhos, Susilene Nunes Vieira Baptista, por todo apoio e compreensão, paciência em meio a tantas noites em claro, viagens e momentos de folga sacrificados em nome da ciência. Sua dedicação ao meu sucesso é reconhecida e admirável. Agradeço também pela sua (nossa) família, a qual tenho certeza que todos torcem por meu sucesso. Te amo.

Ao professor Lúcio, meu orientador, pela chance que me foi dada e confiança depositada desde o mestrado, quando pouco me conhecia e mesmo assim “apostou” em mim. Sempre solícito, dedicado e exemplo que levarei, agora como colega professor, por minha vida acadêmica. Levarei principalmente sua relação fraternal com seus orientados, entendendo que cada um deles é um ser humano, com aspirações, desejos e problemas individuais, não devendo ser tratados no coletivo. Interrompemos aqui nosso relacionamento orientado-orientador, porém a amizade segue sólida como uma rocha!

Às minhas grandes amizades iniciadas e consolidadas durante o mestrado e o doutorado, em especial Artur César de Carvalho Fernandes, Tamyres Izarely Barbosa da Silva, Roniery Carlos Gonçalves Galindo e Renata Gomes Revorêdo. Tenho certeza que amigos para o resto da vida!

Agradecimento especial à Unidade Acadêmica de Garanhuns por me proporcionar um dos mais felizes momentos profissionais por qual passei, e por me proporcionar amizades honestas e sinceras de pessoas especiais, que torcem muito por mim (e a recíproca é verdadeira), como Taciana Rabelo Ramalho Ramos e Marcos Pinheiro Franque. Pessoas únicas e especiais.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, minha casa, onde iniciei há mais de 14 anos uma jornada de muitos conhecimentos e felicidades e claro, em especial os professores, que são a Universidade. Não os cito aqui para não ser injusto com algum.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária e seus professores pelos conhecimentos passados e oportunidade de aprender com profissionais tão competentes.

Aos nossos estagiários, que muito ajudaram em nossas pesquisas.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

*“A humildade exprime uma das raras certezas de que
estou certo: a de que ninguém é superior a ninguém.”*
Paulo Freire

RESUMO

Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) e Tuberculose dos Bovinos (TB) são doenças infecciosas que causam grandes prejuízos à pecuária leiteira devido ao descarte de animais, condenação de carcaças e serviços veterinários. O objetivo com a realização deste trabalho foi avaliar o desempenho de kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) comerciais importados (IDEXX®) no diagnóstico e controle da LEB e TB em bovinos leiteiros infectados naturalmente criados no estado de Pernambuco. O ELISA vem sendo progressivamente testado para auxiliar o diagnóstico de ambas as enfermidades, com a finalidade de aumentar a sensibilidade dos resultados. Enquanto que na LEB visa-se a substituição progressiva da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) por uma técnica mais sensível, na TB a técnica poderia ser utilizada em conjunto com o teste da tuberculina, para a detecção de animais em distintas fases da resposta imunológica ao agente etiológico. Amostras de soro sanguíneo de 327 bovinos leiteiros do estado de Pernambuco foram submetidas à IDGA e ao ELISA comercial importado CHEKIT-*Leucose-serum*, produzido pelo laboratório IDEXX® para o diagnóstico da LEB. Descartadas 25 amostras inconclusivas a um ou a ambos os testes, 302 amostras foram examinadas, sendo 24,1% positivas (73/302) na IDGA e 45% (136/302) no ELISA. A falta de concordância entre os métodos diagnósticos ocorreu devido, provavelmente, à elevada sensibilidade do ELISA, que possibilita detectar anticorpos mesmo em situações com baixos teores séricos. O ELISA, em relação à IDGA, técnica considerada padrão, sensibilidade de 98,6%, especificidade de 72% e índice *Kappa* de 0.55. Em relação ao diagnóstico da TB, foram considerados 379 bovinos, sendo submetidos ao teste da tuberculina cervical comparado (TCC) e amostras de soro sanguíneo dos mesmos examinadas para identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium bovis*, com o uso do kit ELISA IDEXX® *M. bovis* Ab Test. Dos 379 bovinos examinados, 16 (4,2%) apresentaram positividade ao TCC e 10 (2,6%) ao ELISA. Os resultados obtidos associados à tuberculose, com o uso simultâneo dos dois testes, possibilitariam o descarte de 26 bovinos infectados e não de 16, caso fosse usado o TCC isoladamente, resultando na permanência de 10 bovinos potencialmente infectados e disseminadores da doença. Conclui-se que o ELISA é relevante no controle e erradicação da LEB e da TB, podendo seu uso na LEB ocorrer em substituição à IDGA e na TB em conjunto com o teste da tuberculina.

Palavras-chave: Sorodiagnóstico; Ruminantes; *Mycobacterium bovis*; Vírus da Leucose Bovina.

Abstract

Enzootic Bovine Leukosis (EBL) and Bovine Tuberculosis (BT) are infectious diseases that cause great losses to the dairy industry due to the discard of animals, carcasses condemnation and veterinary services. The aim with this work was to evaluate the performance of a commercial imported (IDEXX®) enzyme linked immunoassay kits (ELISA) on the diagnosis and control of EBL and BT in dairy cattle naturally infected raised in the state of Pernambuco. The ELISA has being tested for assisting the diagnosis of both diseases, with the purpose of increasing the results sensitivity. While the efforts aim progressively to replacement of the agar gel immunodiffusion (AGID) for a more sensitive technique on the EBL diagnosis, about the BT the technique could be used in conjunction with the tuberculin test for the detection of animals at different stages of the immune response to the etiological agent. Blood serum samples from 327 dairy herds in the state of Pernambuco were subjected to AGID and commercial imported ELISA CHEKIT-*leucosis-serum*, produced by IDEXX® laboratory, for the diagnosis of EBL. 25 samples that resulted inconclusive to one or both tests were discarded. 302 samples were examined, resulting positive 24.1% (73/302) in the AGID and 45% (136/302) in the ELISA. The lack of agreement between the diagnostic methods was probably due to the high sensitivity of ELISA, which detects antibodies even in situations with low serum levels. The ELISA in relation to the AGID, considered the standard technique, had a sensitivity of 98.6%, specificity of 72% and *Kappa* 0.55. About the TB diagnosis, 379 cattle were tested for cervical compared test (CCT) and had blood serum samples examined for identification of anti-*Mycobacterium bovis* antibodies throught the ELISA kit IDEXX® *M. bovis* Ab Test. From the 379 cattle examined, 16 (4.2%) were positive to CCT and 10 (2.6%) to ELISA. The results associated to tuberculosis, with the simultaneous use of both tests, would allow the discard of 26 infected cattle and not 16, if the CCT had been used alone, resulting in remaining 10 potentially infected cattle and disseminators of the disease. It is concluded that the ELISA is relevant in the control and eradication of EBL and BT, its application on EBL diagnosis may replace the AGID, as well as in the TB, together with the tuberculin skin test.

Keywords: Serodiagnosis; Ruminants; *Mycobacterium bovis*; Bovine leukemia virus.

Lista de ilustrações

	Pág.
	22
Artigo 1	54

Lista de tabelas e quadros

	Pág.
Artigo 1	
Tabela 1. Associação dos resultados da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina em bovinos leiteiros naturalmente infectados criados no estado de Pernambuco.	41
Artigo 2	
Quadro 1. Bovinos leiteiros positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC) ou ao ELISA criados no estado de Pernambuco	53

Lista de abreviaturas e siglas

LEB – Leucose enzoótica dos bovinos

TB – Tuberculose bovina;

ELISA – Ensaio imunoenzimático;

IDGA – Imunodifusão em gel de ágar;

MB – *Mycobacterium bovis*;

VLB – Vírus da leucose bovina;

μL – Microlitro;

mL – Mililitro;

TCC – Teste cervical comparativo;

RIMC – Resposta imune do tipo celular

PE – Pernambuco;

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento;

OD – Densidade óptica (*optical density*)

PNCETB – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovina;

mm – Milímetro;

OMS - Organização Mundial de Saúde;

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Leucose Enzoótica dos Bovinos	17
3.2 Tuberculose Bovina	20
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS	36
5.1 Avaliação do desempenho de ELISA importado no sorodiagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos do estado de Pernambuco	37
5.2 Uso simultâneo do teste da tuberculina e do ELISA para o diagnóstico e controle da tuberculose bovina em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco	47
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7 APÊNDICES	56

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira vem desenvolvendo-se, ano após ano, com elevadas taxas de produção mundial. Dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2015), mostram que no ano de 2013, 635 bilhões de litros de leite foram produzidos em todo o mundo. Nesse concorrido mercado, o Brasil é o sexto maior produtor, atingindo uma produção de 34 bilhões de litros nesse mesmo ano.

A crescente demanda por aumento na produtividade pecuária, associada à inadequada situação sanitária a que os rebanhos são frequentemente submetidos, comprometem a saúde e, conseqüentemente, o desempenho produtivo dos animais. Nesse contexto, inserem-se diversas enfermidades, dentre elas a Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) e a Tuberculose Bovina (TB), que são afecções que coexistem nos rebanhos brasileiros e em especial no estado de Pernambuco (MELO, 1999; MELO et al., 2010; FERNANDES et al., 2011; MENDES et al., 2011), sendo ambas responsáveis por grandes perdas, como diminuição da produção, condenação de carcaças e aumento dos gastos com animais de reposição, assistência veterinária e restrição na exportação de animais ou derivados (D'ANGELINO; GARCIA; BIRGEL, 1998).

Tanto a LEB quanto a TB parecem ter uma maior difusão em raças de exploração leiteira devido ao manejo intensivo ou semi-intensivo e a maior permanência dos animais nos rebanhos nestes tipos de exploração (LORENZ & STRAUB, 1987; RADOSTITS et al., 2007)

A LEB é uma doença infecto-contagiosa de caráter crônico causada por um retrovírus, o Vírus da Leucose Bovina (VLB), e que além de causar perdas diretas, possui grande importância no desencadeamento de doenças oportunistas, com destaque inclusive para a TB, pelo caráter imunossupressor do VLB (BURNY e MAMMERICKX, 1987; AZEDO, 2007; AZEDO et al., 2008 e 2011; FRIE & COUSSENS, 2015).

A TB, causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis*, é uma doença de caráter crônico que apresenta sinais como emaciação progressiva e proliferação nodular granulomatosas (RADOSTITS et al., 2007)

Para o diagnóstico da LEB e da TB as técnicas mais utilizadas são a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), já utilizada há mais de 40 anos (MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; BIRGEL et al., 1982), e o teste da reação imunoalérgica, preconizado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006), respectivamente.

O ensaio imunoenzimático (ELISA) vem sendo progressivamente testado para auxiliar diagnóstico de ambas as enfermidades, com o objetivo de se aumentar a confiabilidade dos resultados, porém com objetivos distintos. Enquanto que na LEB visa-se a substituição progressiva da IDGA por uma técnica mais sensível, em etapas mais avançadas em programas de controle e erradicação da doença (YEON CHOI, LIU & BUEHRING, 2002), na TB, a técnica é utilizada em conjunto com o teste imunoalérgico, para a detecção de animais em diferentes fases da resposta imunológica ao agente etiológico, quer seja na resposta imune do tipo celular (tuberculinização), ou na resposta humoral (ELISA) (BRASIL, 2006; MEDEIROS et al., 2010).

Nesse contexto, o desenvolvimento do presente estudo justifica-se pela necessidade de avanço no controle e erradicação de doenças de grande importância clínico-epidemiológica, como a LEB e a TB, com o emprego de técnicas auxiliares ao diagnóstico mais eficazes.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho de kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) comerciais importados (IDEXX®) no diagnóstico e uso no controle da LEB e TB em rebanhos leiteiros criados no estado de Pernambuco.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar o uso de kit ELISA CHEKIT-*Leucose-serum* (IDEXX®) com a Imunodifusão em Gel de Ágar em bovinos naturalmente infectados pelo VLB criados no Estado de Pernambuco;
- Avaliar o desempenho e aplicabilidade do kit ELISA *Mycobacterium bovis Ab Test* (IDEXX®) em bovinos naturalmente infectados criados no Estado de Pernambuco.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leucose Enzoótica dos Bovinos

A LEB é uma doença insidiosa, de natureza infectocontagiosa e de evolução crônica, cosmopolita, causada pelo VLB, um Deltarretrovírus exógeno linfotrópico B, que compromete primariamente o sistema linfoide do bovino infectado, determinando processos desorganizativos dos seus tecidos e órgãos, especialmente linfonodos, que perdem as características primárias e vão sendo progressivamente substituídos por um novo tecido, de natureza neoplásica, formador de linfossarcomas, podendo haver ou não leucemização (International Committee on Bovine Leucosis, 1968; STÖBER, 1970; FRANCKI et al., 1991; MELO, 1991; MURPHY, 1999; JAIN, 1993; LEITE et al., 2001; FRIE & COUSSENS, 2015).

A etiologia viral da LEB foi definitivamente estabelecida por Miller e Olson, em 1972, que isolaram o vírus em cultura de linfócitos bovinos com sintomas aparentes ou não da doença, determinando, através da microscopia eletrônica, a presença de partículas virais.

Estudos citogenéticos e imunossorológicos demonstraram haver uma sequência nuclear homóloga entre o VLB e viroses linfotrópicas T humanas, assim como a ocorrência de reações cruzadas de anticorpos entre soros bovinos e humanos infectados (MARUYAMA et al., 1989; MATSUOKA e JEANG, 2007), levaram o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Viroses a incluí-lo no gênero VLTH-VLB (vírus linfotrópicos de células T Humanas + Vírus linfotrópicos de células B), espécie Vírus da Leucemia Bovina (FRANCKI et al., 1991), até a designação atual mais apropriada de VLB.

A ocorrência da LEB é determinada, com segurança, quando há registro no histórico do indivíduo ou de seu rebanho de origem da coexistência dos aspectos nosológicos (expressão clínica da doença), hematológico (ocorrência de leucocitose por linfocitose, associada à atipias destas células) e imunológico (detecção sorológica de anticorpos anti-VLB). Essas foram as configurações apresentadas por vários pesquisadores, como sendo necessárias para a afirmação da ocorrência da LEB em um indivíduo ou no rebanho (GÖTZE *et al.*; 1954; ROSENBERGER, 1961 e 1968; MAMMERICKX *et al.*, 1976; RESSANG *et al.*, 1976).

Na cadeia epidemiológica da LEB, infecção e doença representam a mesma importância (BIRGEL et al., 1982), aspecto este que torna os animais portadores do

VLB, além de fonte natural, agentes de alta infecciosidade e precursores da gênese da LEB em uma população de bovinos.

Observa-se uma maior disseminação do VLB entre animais de exploração leiteira, em relação aos animais destinados a produção de carne, sendo essa maior susceptibilidade associada a variações de manejo e a maior permanência dos animais nos rebanhos (LORENZ & STRAUB, 1987).

Os aspectos de transmissibilidade do VLB têm sido exaustivamente estudados durante anos, demonstrando que a transmissão natural do vírus pode ocorrer horizontal ou verticalmente (GÖTZE et al., 1954; ROSENBERGER, 1961 e 1968; FERRER e DIGLIO, 1976; VAN DER MAATEN e MILLER, 1979; MAMMERICKX et al., 1978; WILESMITH et al., 1980; BUXTON et al., 1982; BIRGEL et al., 1982; BRIGHTLING e RADOSTITS, 1983; EVERMANN et al., 1987; LORENZ e STRAUB, 1987; STEWART et al., 2015). O fato das partículas virais livres serem bastante instáveis torna as células infectadas, como linfócitos-B, monócitos e macrófagos presentes no sangue ou leite os principais veículos na transmissão natural do VLB (KETTMANN et al., 1994).

A transmissão horizontal do VLB é favorecida pelo convívio íntimo e prolongado de animais que vivem em constantes condições de estresse, como a rotineira mudança do pasto para estabulação, podendo ocorrer quando expostos ao leite ou colostro de animais infectados, secreções (salivar, nasal, genital) e excreções (urina e fezes) (ROSENBERGER, 1961 e 1968; MAMMERICKX et al., 1978; WILESMITH et al., 1980; TSUTSUI et al., 2010).

A transmissão iatrogênica é certamente a via de maior difusão do VLB, sendo necessários, apenas 2.500 linfócitos (0,05 μ L de sangue) para, através de inoculação, determinar-se a infecção (VAN DER MAATEN e MILLER, 1979). Normas inadequadas de palpação retal, vacinação, tratamento sistêmico utilizando injeções intramusculares, subcutâneas ou intravenosas contaminadas com sangue, colheitas ou transfusões de sangue, além de fômites contaminados usados em procedimentos cirúrgicos, podem difundir intensamente o VLB em um rebanho (BIRGEL et al., 1982; BRIGHTLING e RADOSTITS, 1983; LORENZ e STRAUB, 1987; KOHARA et al., 2006).

Verticalmente, por via placentária, o VLB pode infectar linfócitos fetais, o que caracterizaria uma infecção intrauterina, que ocorre entre 8 e 20% dos casos de contágio estando associado a uma imunossupressão temporária que ocorre na vaca durante a

prenhez, e com riscos maiores para bezerros nascidos de vacas com linfocitose persistente (FERRER, 1979; EVERMANN et al., 1987; AGRESTI, 1993). A transmissão vertical via colostro também é citada na literatura como possível (TSUTSUI et al., 2010), porém, Nagy et al. (2007) ao estudarem a transmissão por esta via sugeriram que bezerros alimentados com colostro de vacas VLB positivas apresentaram uma menor taxa de infecção.

A maioria dos animais infectados pelo VLB não apresentam sintomatologia clínica, cerca de 30% destes apresentam um quadro de linfocitose persistente e apenas 1 a 5% desenvolvem linfossarcoma (KOHARA et al., 2006; TSUTSUI et al., 2016). No contexto da transmissão do VLB tanto os animais assintomáticos quanto os que desenvolvem sintomatologia merecem atenção. O primeiro por se caracterizar como uma fonte silenciosa de transmissão no rebanho e o segundo, por apresentar elevada carga viral com maior chance de transmissão (KOHARA et al., 2006; JULIAREMA et al., 2007; TSUTSUI et al., 2016).

A doença teve sua ocorrência pioneiramente registrada em Pernambuco nos achados clínico-hematológicos e histopatológicos de Cavalcante et al. (1969), em bezerros procedentes do Agreste. Mais tarde, em 1991, Melo confirmou sorologicamente (IDGA) a ocorrência da doença no estado, verificando uma prevalência de 15,1% (67/443) em rebanhos de Garanhuns e municípios circunvizinhos. Mendes (2002) encontrou uma incidência de 14,7 % (39/265) de bovinos reagentes à IDGA, em rebanhos examinados no estado de Pernambuco. Em dados mais recentes, Fernandes et al. (2011) apresentaram frequência de 24% (343/1.421) de bovinos VLB positivos em rebanhos localizados em municípios pernambucanos do Agreste, Sertão, Zona da Mata e Região Metropolitana do Recife.

Os testes sorológicos têm sido a metodologia recomendada para a identificação precoce de focos da LEB, destacando-se o ELISA e a IDGA (MILLER e OLSON, 1972; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; ALTANER et al., 1982; TRONO et al., 2001; GUTIÉRREZ et al., 2009; TIRZIU et al., 2014).

O ELISA possui algumas vantagens quando comparada à IDGA, como um menor tempo requerido para a realização do teste, possibilidade da realização de *pools* e maior sensibilidade, sendo bem aplicado em casos de baixos títulos de anticorpos (BRENNER et al., 1994; TRONO et al., 2001; OIE, 2008; EL-HAFEIZ et al., 2010; TIRZIU et al., 2014). Tais benefícios estão levando alguns países a substituir a IDGA pelo ELISA em seus programas de erradicação (MAMMERICKX et al., 1985;

MOLLOY et al., 1990; KLINTEVALL et al., 1991; GIBSON, 1995; MARESCA et al., 2015).

Admite-se que a LEB seja um fator de risco para a ocorrência de enfermidades oportunistas, com destaque para a TB, sendo a intercorrência entre as duas doenças nos rebanhos leiteiros registrada em diversas situações (MELO, 1999; MELO et al., 2010; FERNANDES et al., 2011; MENDES et al., 2011; FRIE & COUSSENS, 2015), demandando atenção de pesquisadores e autoridades sanitárias.

3.2 Tuberculose Bovina

A TB é uma doença transmissível causada pelo *Mycobacterium bovis*, sendo caracterizada pela evolução crônica, desenvolvimento progressivo de lesões nodulares (tubérculos) em diversos órgãos ou tecidos e considerada uma das zoonoses mais importantes para a saúde pública (ROSENBERGER, 1983; CORRÊA e CORRÊA, 1992; ROXO, 1996; COSIVE et al., 1998; DIRKSEN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007; WATERS et al., 2014).

A doença é um grave problema nos rebanhos leiteiros dos países em desenvolvimento, especialmente quando as criações são submetidas a um manejo mais intensivo e falho em seus aspectos sanitários, condições estas que acarretam queda na produtividade e condenação de carcaças em matadouros, gerando, em decorrência disso, expressivos prejuízos econômicos aos produtores (ROSENBERGER, 1983; COSIVE et al., 1998; RADOSTITS et al., 2007).

A TB caracteriza-se clinicamente por possuir evolução crônica, com os acometidos manifestando emagrecimento progressivo, proliferações nodulares granulomatosas (em forma de “tubérculos”), com aumento de volume de linfonodos por todo o corpo, podendo haver comprometimento de órgãos como pulmão, fígado, intestino, baço e peritônio. Entre os bovinos é comum a presença de portadores inaparentes de infecções com três a seis semanas desde o contato inicial com o *M. bovis* (FRANCIS et al., 1978; ROSENBERGER, 1983; CORRÊA e CORRÊA, 1992; ROXO, 1996; COSIVE et al., 1998; DIRKSEN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007).

O diagnóstico da TB é estabelecido pelo exame clínico dos animais, coadunando-se parâmetros da anamnese (histórico do caso) e físicos (sinais) com exames complementares, que incluem os testes tuberculínicos, os exames anatomopatológicos (post mortem e histopatológicos) e bacteriológicos, bem como pela

interpretação dos achados epidemiológicos (OPAS, 1962; DIRKSEN et al., 1993; DIRKSEN et al., 2005; SCHILLER et al., 2010).

A técnica preconizada no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006) é o teste da reação imunoalérgica. Porém em algumas situações, ocorre o fato de animais infectados serem negativos aos testes baseados na resposta imune celular (BRASIL, 2006; LILENBAUM & FONSECA, 2006; MEDEIROS et al., 2010; PRAKASH et al., 2015; RAMOS et al., 2015).

A ausência de resposta aos testes baseados na resposta imune mediada por células, como a tuberculinização, é um aspecto importantíssimo no estudo da epidemiologia da tuberculose, e tem sido motivo de investigações. Admite-se que infecção precoce (LEGG e MAUNDER, 1941), doença em estágio avançado, caracterizado por lesões em fase de cura ou alterações imunopatológicas (KLEEBERG, 1960), estresse associado ao parto, infecção intercorrente, desnutrição, exaustão e transporte (LEGG e MAUNDER, 1940a, b; MAUNDER, 1948) podem reduzir o grau de reatividade aos testes tuberculínicos e, conseqüentemente, possibilitar aparecimento de falso-negativos em alguns rebanhos (LILENBAUM & FONSECA, 2006; PRAKASH et al., 2015). Sendo assim, é crescente a ideia de que um único método diagnóstico é incapaz de detectar todos os animais tuberculosos, sendo necessária a utilização de outras ferramentas simultaneamente (SALFINGER e PFYFFER, 1994; WHO, 1994; LILENBAUM & FONSECA, 2006; JEON et al., 2010; MEDEIROS et al., 2010; PRAKASH et al., 2015; RAMOS et al., 2015).

Outras técnicas para a detecção de bovinos infectados incluem a reação da polimerase em cadeia (PCR) (WARDS et al., 1995; DE PAULA JÚNIOR et al., 2011), o ensaio imunoenzimático (ELISA) (DE ANDA et al., 1996; GOFF et al., 1996; JEON et al., 2010; SCHILLER et al., 2010; WATERS et al., 2011) e o ensaio de interferón-gama (CEPANZO, 1988; RIET-CORREA e GARCIA, 2001; SCHILLER et al., 2010). Existem outras ferramentas como a fixação do complemento, imunoflorescência, aglutinação bacteriana direta, precipitina e testes de hemaglutinação, porém estes possuem menor valor para a rotina (BIER, 1984; DOMINGO et al., 1995; WHIPPLE et al. 1995; RADOSTITS et al., 2007; SCHILLER et al., 2010).

A elaboração de um kit ELISA mais acurado para a detecção de anticorpos anti-*M. bovis* tem sido considerado por alguns autores uma tarefa árdua (SCHILLER et al., 2010). Isto reside no fato de que a primeira célula do sistema imunológico a interagir com o *M. bovis* são os macrófagos. Porém tais células possuem papel dicotômico na

infecção. Se por um lado, são importantes no efetivo combate ao patógeno, por outro são as células alvo preferidas pelo *M. bovis* para serem albergados. A debelagem ou não da infecção depende de complexas interações entre os macrófagos e o patógeno (POLLOCK e NEILL, 2002).

Caso a micobactéria se evada dos mecanismos citados, e estabeleça-se no interior de macrófagos, este inicia o processamento e secreção de antígenos, apresentando-os aos linfócitos T. Esta interação macrófago - linfócito T é o marco inicial da resposta imune adquirida, onde linfócitos T irão iniciar a expansão policlonal e diferenciação, criando assim a “memória imunológica” (POLLOCK e NEILL, 2002).

Apenas com o avançar da doença, os linfócitos B ganham destaque, com a produção de anticorpos (Fig. 1), que apesar de possuir importância imunológica limitada, já se admite importância na proteção conferida por eles (GLATMAN-FREEDMAN e CASDEVALL, 1998; WATERS et al., 2014; PRAKASH et al., 2015), ganhando importância nesta fase os testes sorológicos.

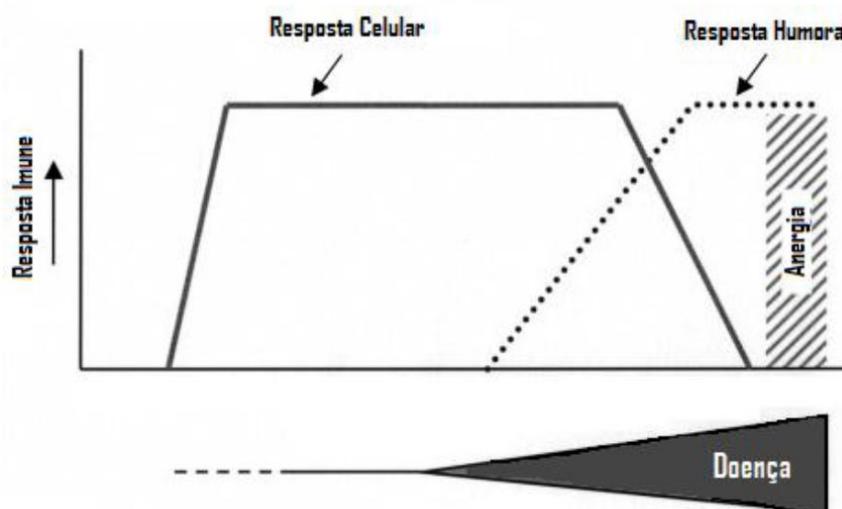


Figura 1. Diagrama representativo da resposta imune em relação à progressão da tuberculose bovina (BAPTISTA FILHO, 2012).

A TB ganha dimensão destacada na saúde pública (MICHEL et al., 2010; WATERS et al., 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para a perspectiva de que entre os anos 2000 e 2020, um bilhão de pessoas estarão infectadas, e 20% destas adoecerão, com 35 milhões indo a óbito, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2011). Destes casos, uma proporção potencialmente importante ocorrerá devido ao *M. bovis*, na chamada Tuberculose Zoonótica, entidade

clínica incluída no grupo das doenças infecciosas emergentes (COSIVE et al., 1998; WATERS et al., 2014).

A tuberculose zoonótica é transmissível do gado para humanos ou vice-versa, diretamente pela via aerógena, mediante a inalação do *Mycobacterium* suspenso no ar, e indiretamente, pelo consumo de leite e de produtos lácteos não fervidos ou pasteurizados (GRANGE e YATES, 1994; WHO, 1994). Assim, materiais biológicos como o produto de tosse, espirro e expectoração, corrimento nasal, leite, urina, fezes, secreções vaginais e uterinas, são considerados potentes meios de contaminação entre homens, animais, e entre homens e animais. Nesse contexto, os principais grupos de risco são os tratadores de animais, funcionários de matadouros ou laticínios, e indivíduos que mantêm o hábito de consumir leite *in natura* ou derivados lácteos que não sofreram prévio tratamento térmico (SOUZA et al., 2002). Desta forma, instala-se o ciclo zoonótico mediante a estreita relação entre homens e animais (FERNANDES, 2002; MELO et al., 2004; WATERS et al., 2014).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRESTI, A. et al. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, p.373–378, 1993.

ALTANER, C.; ZAJAC, V.; BAN, J. A. A simple and inexpensive method for detection of BLV infected cattle based on modified ELISA principle. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v.29, n.8, p.583-590, 1982.

AZEDO, M. R. **Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa dos leucócitos**. São Paulo, 2007. 151p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

AZEDO, M. R.; BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, p.1131-1140, 2011.

AZEDO, M. R.; MASSOCO, C. O.; BLAGITZ, M. G.; SANCHES, B. G. S.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; SAKAI, M.; SÁ-ROCHA, L. C.; KFOURY JUNIOR, J. R.; STRICAGNOLO, C. R.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Influência da leucose enzoótica bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 390-397, 2008.

BAPTISTA FILHO, L. C. F. **Análise leucométrica em bovinos tuberculizados e sua aplicação no monitoramento da leucose enzoótica em rebanhos do Estado de Pernambuco**. Recife, 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 3 ed. Rio de Janeiro, Melhoramentos, 1984. 1234p.

BIRGEL, E.H. Leucose linfática enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In: **SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA**. Patologia clínica veterinária. São Paulo, p. 249-60, 1982.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): Manual técnico. Brasília, 2006. 184p.

BRENNER, J.; MOSS, S.; MOALEM, U. A comparative study of the Elisa and AGID techniques for the detection of bovine leucosis virus antibodies in bovine serum and milk. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.49, n.4, p.165-167, 1994.

BRIGHTLING, P.; RADOSTITS, O.M. Bovine leukosis virus infection in a dairy herd in Saskatchewan. **Canadian Veterinary Medicine**, v. 44, p. 168-75, 1983.

BURNY, A.; MAMMERICKX, M. Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. **Developments in Veterinary Virology**. Boston (Series III), 1987. 282p.

BUXTON, B.A.; HINKLE, N. C.; SCHULTZ, R. D. Role of insects in transmission by mosquitoes. **American Journal, of Veterinary Research**, v.43, p.1458-9, 1982.

CAVALCANTE, M. I.; BARRETO, S. C. P.; COSTA FILHO, G. A. Sobre a ocorrência da leucose bovina no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, p. 225-227, 1969.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Manual de normas y procedimientos tecnicos para la bacteriologia de la tuberculosis**. Parte I: La muestra. El exame microscopico. Buenos Aires: CEPANZO, 1988. 30p.il. (Notas tecnicas, 26/ rev 1). 16

CORRÊA, W. M.; CORRÊA C. N. M.. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos - Tuberculose**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1992. p.317-337.

COSIVE, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; *et al.* Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging infectious Diseases**, v.4, n.1, 1998.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. **Tropical Annals Health Production, Dordrecht**, v.30, p.13-15, 1998.

DE ANDA, J. H.; MONAGHAN, M.; COLLINS, J. D.; BRENNAN, P. J.; SALMAN, M. D. Evaluation of MPB70, bovine PPD and lipoarabinomannan as antigens in ELISA

for the serodiagnosis of bovine tuberculosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.27, p.211-215, 1996.

DE PAULA JUNIOR, A. R.; SILVA, T. I. B.; FERNANDES, A. C. C.; BAPTISTA FILHO, L. C. F.; SOUZA, A. C. M.; MAIA, F. C. L.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; MELO, L. E. H. Identificação Biomolecular do *Mycobacterium bovis* em Bovino Leiteiro Criado na Mesorregião Metropolitana do Recife, Pernambuco. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, Supl. 3, p.835-838, 2011.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Rosenberger – Exame clínico dos bovinos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Medicina interna y cirugía del bovino**. 4.ed. Buenos Aires: Inter.-Médica, 2005, v.2, 406p.

DOMINGO, M., LIÉBANA, E., CARRERA, J., VILAFRANCA, M., CASAL, J., ARANAZ, A., ALTIMIRA, J., VIDAL, D., MARCO, A., PANELL, J.M., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L. Eficácia comparativa de la intradermorreacción y la prueba de liberación de gama-interferón para el diagnóstico de La tuberculosis bovina en una prueba de campo. **Medicina Veterinaria**, v.12, n.5, p.307-317, 1995.

EL-HAFEIZ, Y. G. M; METIAS, K. N; ABRAHIM, I. G. A. Comparative Serological Detection of Enzootic Bovine Leukosis Virus (EBLV) in cattle sera. **Global Veterinaria**, v.4, n.3, p.267-270, 2010.

EVERMANN, J.F. et al. Bovine leukosis virus: understanding viral transmission and the methods of control. **Veterinary Medicine**, v. 82, p.1051-8, 1987.

FERNANDES, A. C. C., TENÓRIO, T. G. S.; SILVA, T. I. B.; MENDES, E. I.; BAPTISTA FILHO, L. C. F.; MELO, L. E. H. Leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos: estudo retrospectivo e prospectivo da ocorrência em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, Supl. 3, 2011.

FERNANDES, M. A. **Avaliação das características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de cabras, das raças Saanen e Alpina, criadas no Estado de São Paulo**. 2002. 152f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

FERRER, J. F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.175, p.1281–1286, 1979.

FERRER, J. F.; DIGLIO, C. A. Development of an in vitro infectivity assay for the C type bovine leukemia virus. **Cancer Research**, v.36, p.1068-73, 1976.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. FAOSTAT – FAO Statistics Division, 2015. Disponível em: <http://www.faostat3.fao.org/> Acesso em: 25/11/2015

FRANCIS, J.; SEILER, R. J.; WILKIE, W. I.; O'BOYLE, D.; LUMSDEN, M. J.; FROST, A. J. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. **Veterinary Record**, v.103, p.420–435, 1978.

FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses. **Supplementum de Archives of Virology**, v.2, p.47-298, 1991.

FRIE, M. C.; COUSSENS, P. M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 163, n. 3, p. 103-114, 2015.

GIBSON, L. A. Testing for enzootic bovine leukosis. **Veterinary Records**, v.136, n.6, p.156, 1995.

GLATMAN-FREEDMAN, A.; CASADEVALL, A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.514–532, 1998.

GOFF, B. S. L. Effect of dexamethasone treatment of tuberculous cattle on results of the gamma-interferon test for *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.53, p.39-47, 1996.

GÖTZE, R.; ROSENBERGER, G.; ZIEGENHAGEN, G. Die Leukose des Rindes: Ihre hamatologische und klinische Diagnose. **Monatshefte für Veterinarmedizin**, v.9, p.517-526, 1954.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.137-151, 1994.

GUTIÉRREZ, G.; ALVAREZ, I.; FONDEVILA, N.; POLITZKI, R.; LOMÓNACO, M.; RODRÍGUEZ, S.; DUS SANTOS, M.J.; TRONO, K. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.137, Iss.3-4, n.12, p.224-234, 2009.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON BOVINE LEUKOSIS. **Journal of the National Cancer Institute**, v.41, p.243-63, 1968.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea & Febiger. Philadelphia, 1993. 417p.

JEON, B.; KIM, S.; JE, S.; KWAK, J.; CHO, J.; WOO, J.; SEO, S.; SHIM, H.; PARK, B.; LEE, S.; CHO, S. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using milk samples as a potential screening test of bovine tuberculosis of dairy cows in Korea. **Research in Veterinary Science**, v.88, p.390–393, 2010.

JULIARENA, M. A.; GUTIERREZ, S. E.; CERIANI, C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. **Am J Vet Res.**, v. 68, n.11, p.1220-5, 2007.

KETTMANN, R.; BURNY, A.; LEVY, J.A. **Bovine leukemia virus. In the retroviridae**. Ed. Plenum Press: New York, NY, USA, 1994; v. 3, p. 39–81.

KLEEBERG, H. H. The tuberculin test in cattle. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v.31, p.213–225, 1960.

KLINTEVALL, K.; NASLUND, K.; SVEDLUND, G.; HAJDU, L.; LINDE, N.; KLINGEBORN, B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukemia virus in milk and serum. **Journal of Virological Methods**, v.33, n.3, p.319-333, 1991.

KOHARA J, KONNAI S, ONUMA M. Experimental transmission of bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. **Jpn J Vet Res.**, v. 54, n. 1, p. 25-30, 2006.

LEGG, J.; MAUNDER, J. C. J. Further tests with synthetic medium tuberculins. **Australian Veterinary Journal**, v.16, n.68, p.68-83, 1940a.

LEGG, J.; MAUNDER, J. C. J. Synthetic medium tuberculins the single intradermal caudal fold test. **Australian Veterinary Journal**, v.16, n.50, p.50-67, 1940b.

LEGG, J.; MAUNDER, J. C. J. Synthetic medium tuberculins: the behavior of the very advanced case of tuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, v.17, n.6, p.229-232, 1941.

LEITE, R. C.; LOBATO, E. I. P.; CAMARGOS, M. F. Leucose Enzoótica Bovina. **Revista CFMV**, n.24, p. 20-25, 2001.

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.

LORENZ, R. J.; STRAUB, O. C. The epidemiology of enzoótic bovine leukosis. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. ed. **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston, Martinus Nijhoff, p.51-68, 1987.

MAMMERICKX, M. Erradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the GP immunodifusion test. **Annales de Recherches Veterinaires**, v.9, p.885-94, 1978.

MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples. **Zentralblatt für Veterinarmedizin. B**, v.32, p.526-533, 1985.

MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; KETTMANN, R.; GHYSDAEL, J.; BURNY, A.; DEKEGEL, D. Diagnostic tests of bovine leukemia. Comparison between and hematological test and the serological diagnosis. **European Journal of Cancer**, v.12, p.433-9, 1976.

MARESCA, C.; COSTARELLI, S.; DETTORI, A.; FELICI, A.; ISCARO, C.; FELIZIANI, F. Enzootic bovine leukosis: Report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005–2012). **Preventive veterinary medicine**, v. 119, n. 3, p. 222-226, 2015.

MARUYAMA, K.; FUKUSHIMA, T.; MOCHIZUKI, S. Cross-reactive antibodies to BLV and HTLV in bovine and human hosts with retrovirus infection. **Amsterdam. Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.22, p.265-73, 1989.

MATSUOKA, M.; JEANG, K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat. Rev. Cancer**, v.7, p.270–280, 2007.

MAUNDER, J.C.J. The control of tuberculosis in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.24, p.313-319, 1948.

MEDEIROS, L.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 531-541, 2010.

MELO, L. E. H. **Avaliação da Intercorrência entre Leucose Enzoótica, Tuberculose e Leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo**. USP, 1999, São Paulo – Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

MELO, L. E. H. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco**. São Paulo, 1991. 102p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MELO, L. E. H.; ALMEIDA, A. V.; SILVA, J. Á. A.; TENÓRIO, T. G. S.; MELO, M. T. An alert for the zoonotic character of the Bovine Tuberculosis. In: **I Encontro Nacional de Tuberculose, Ministério da Saúde, Rede Brasileira de Pesquisa em tuberculose, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**. Brasília, Anais.... 2004.

MELO, L. E. H.; FERNANDES, A. C. C.; SILVA, T. I. B.; TENÓRIO, T. G. S.; MENDES, E. I.; BAPTISTA FILHO, L. C. F. Estudo retrospectivo e prospectivo da intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. In: **Seminário Nacional Sobre Brucelose e Tuberculose Animal (SNBTA)**. 2010. Belo Horizonte; 2010.

MENDES, E. I. **Aspectos sorológicos e hematológicos como recursos auxiliares ao diagnóstico da leucose enzoótica dos bovinos em rebanhos leiteiros de Pernambuco**. Recife; Dissertação (Mestrado): Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2002. 20

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**, v.140, p.371–381, 2010.

MILLER, J. M.; OLSON, C. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 49, p.1459-62, 1972.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. **European Journal of Cancer**, v.13, p 1369-75, 1977.

MOLLOY, J.B.; WALKER, P.J.; BALDOCK, F.C.; RODWELL, B.J; COWLEY, J.A. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukemia virus p24 antibody in cattle. *J. Virol. Methods*. 28 (1), 47-57, 1990.

MURPHY, F. A. **Veterinary Virology**. 3 ed. USA: Academic Press. 1999. 629p.

NAGY, D.W. et al. Association between the strength of serologic recognition of bovine leukosis virus and lymphocyte count in bovine leukosis virus infected cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.220, p.1681-1684, 2002.

OIE, Manual Terrestre. 2008. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf, (acessado em 02 outubro de 2014).

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). **La inspeccion post mortem de bovinos reactivos a la prueba de tuberculina**. 1962. 31p. (Publicaciones científicas, n. 68).

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v.163, n.2, p.115-127, 2002.

PRAKASH, C.; KUMAR, P.; JOSEPH, B.; NIRANJAN, A. K.; SHARMA, D.; CHAUHAN, A.; SHUKLA, S. K.; VERMA, R. Evaluation of different diagnostics tests

for detection of tuberculosis in cattle. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 39, n. 1, p. 1-4, 2015.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. 2156p.

RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN, O. A.. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842015005123613&lng=en&nrm=iso>. (acessado em 03 de dezembro de 2015).

RESSANG, A. A.; ELLENS, D. J.; MASTENBROEK, N.; JANICE, J. Q.; MILLER, M.; VAN DER MAATEN, M. J. Studies on bovine leukaemia. II - Haematological, serological, virological and electron microscopical diagnosis. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v.23, p.566-79, 1976.

RIET-CORREA, F.; GARCIA, M. Tuberculose. In: RIET CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. (Org.). **Doenças dos ruminantes e eqüinos**. 2.ed. São Paulo, 2001, v.1, p.351-362.

ROSENBERGER, G. Die wissenschaftlichen Grundlagen zur Bekämpfung der Rinderleukose. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, B. v.15. p.193-9, 1968.

ROSENBERGER, G. **Enfermedades de los bovinos**. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur, 1983. v.2. p.139-51.

ROSENBERGER, G. **Leukose des Rindes**. Berlin, Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften, 1961. p.33-45. (Tagungsberichte, 49).

ROXO, E. Tuberculose bovina: Revisão. (Bovine Tuberculosis: review). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.63, n.2, p.91-97, 1996.

SALFINGER, M.; PFYFFER, G. E. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.13, n.11, p.961-979, 1994.

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, n. 4, p. 205-220, 2010.

SOUZA, A. V.; SOUSA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P.; AFONSO L. O. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Revista Higiene Alimentar**, v.59, 2002.

STEWART, J.; RUBESSA, M.; POLKOFF, K.; LOTTI, S.; WHEELER, M. (2015). 245 risk of transmission of bovine leukosis virus (BLV) using seropositive bulls for in vitro fertilization embryo production. **Reprod. Fertil. Dev.** v.28, p.245–245, 2015.

STÖBER, M. Lymphatische Leukose erwachsener Rinder. In: ROSENBERGER, G. **Krankheiten des Rindes**. Berlin, Paul Parey, 1970. p.54-73.

TIRZIU, E.; CUMPĂNĂȘOIU, C.; NICHITA, I.; REMAN, G. D.; SONEA, C.; ȘERES, M. Performance assessment of three tests applied in enzootic bovine leukosis diagnosis. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 19, n. 5, p. 9666-9677, 2014.

TRONO, K. G.; PÉREZ-FILGUEIRA 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.

TSUTSUI, T. et al.. Estimation of the withinherd transmission parameter of bovine leukemia virus. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, p.158–162, 2010.

TSUTSUI, T.; KOBAYASHI, S.; HAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T. Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis. **Preventive veterinary medicine**, v. 124, p. 96-101, 2016.

VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M. Appraisal of control measures for bovine leukosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.175. p.1287-90, 1979.

WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissue by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.43, n.2-3, p.227-240, 1995.

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

WATERS, W. R.; MAGGIOLI, M. F.; MCGILL, J. L.; LYASHCHENKO, K. P.; PALMER, M. V. Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 159, n. 3, p. 113-132, 2014.

WHIPPLE, D.L.; BOLIN, C. A.; DAVIS, A. J.; JARNAGIN, J. L.; JOHNSON, D. C.; NABORS, R. S.; PAYEUR, J.B.; SAARI, D. A.; WILSON, A. J.; WOLF, M. M. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, p.415–419, 1995.

WILESMITH, J.W. Algumas observações sobre a epidemiologia da infecção por vírus da leucose bovina num grande rebanho leiteiro. **Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva** - Trad. de Paulo Ponce de Leon Filho e Lúcio José Gomes Pereira. Recife, Serviço de Defesa Sanitária Animal, v.1, 1980. 16p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis. Fact Sheet No 104. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) memorandum from a WHO meeting with the participation of FAO. **Bulletin of World Health Organization**, v.72, p.8510-8857, 1994.

YEON CHOI, K.; LIU, R.B.; BUEHRING, G.C. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for

detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. **Journal of Virological Methods**, v.104, Issue 1, p.33-39, 2002.

5. ARTIGOS

5.1 Artigo 1 - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE ELISA IMPORTADO NO SORODIAGNÓSTICO DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA EM REBANHOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Revista: Arquivos do Instituto Biológico

Avaliação do desempenho de ELISA importado no sorodiagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos do estado de Pernambuco

Resumo: A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença infecciosa de distribuição cosmopolita e caráter crônico causada por um vírus da família *Retroviridae*, o Vírus da Leucose Bovina (VLB). A situação epidemiológica da LEB no Brasil vem motivando estudos para o aprimoramento do diagnóstico da mesma, tendo como base as técnicas sorológicas recomendadas: a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA). Com isso, objetivou-se avaliar comparativamente o kit ELISA CHEKIT-*Leucose-serum* (IDEXX®) com a IDGA em bovinos leiteiros naturalmente infectados pelo VLB. Amostras de soro sanguíneo de 327 bovinos leiteiros do estado de Pernambuco foram submetidas à IDGA e ao ELISA comercial importado CHEKIT-*Leucose-serum*, produzido pelo laboratório IDEXX® para o diagnóstico da LEB. Descartadas 25 amostras inconclusivas a um ou a ambos os testes, 302 amostras foram examinadas, sendo 24,1% positivas (73/302) na IDGA e 45% (136/302) no ELISA. A falta de concordância entre os métodos diagnósticos ocorreu devida, provavelmente, à elevada sensibilidade do ELISA, que possibilita detectar anticorpos mesmo em situações com baixos teores séricos. O ELISA, em relação à IDGA, técnica considerada padrão, teve sensibilidade de 98,6%, especificidade de 72% e índice *Kappa* de 0.55. Apesar da IDGA se mostrar até o momento um teste eficiente, em etapas mais avançadas de um programa de controle e erradicação da LEB, com baixos índices de prevalência, o ELISA apresentará melhor rendimento, por possuir maior sensibilidade, evitando-se a permanência animais disseminadores da doença nos rebanhos.

Palavras-chave: Bovinos, VLB, imunodifusão, sorologia.

Performance assessment of imported ELISA in the serodiagnosis of the Enzootic Bovine Leucosis in herds of state Pernambuco

Abstract:

The enzootic bovine leucosis (EBL) is an infectious disease of worldwide distribution and chronic condition caused by a virus of the Retroviridae family, the Bovine Leukemia Virus (BLV). The epidemiological situation of EBL in Brazil has motivated studies to improve the diagnosis of the same, based on the recommended serologic techniques: immunodiffusion agar gel (AGID) and enzyme-linked immunoabsorbent Assay (ELISA). It aimed with this study comparatively evaluate the ELISA kit CHEKIT-leucosis-serum (IDEXX®) with AGID in dairy cattle naturally infected by BLV. Blood serum samples were collected from 327 dairy herds in the state of Pernambuco and subjected to AGID and commercial ELISA imported CHEKIT-leucosis-serum produced by IDEXX® laboratory for the diagnosis of EBL. 25 samples that result inconclusive to one or both tests were discarded, 302 samples were examined, resulting positive 24.1% (73/302) in the AGID and 45% (136/302) in the ELISA. The lack of agreement between the diagnostic methods was probably due to the high sensitivity of ELISA, which detects antibodies even in situations with low serum levels. The ELISA in relation to the AGID, considered the standard technique, had a sensitivity of 98.6%, specificity of 72% and *Kappa* 0.55. Despite the AGID show yet an efficient test, in more advanced stages of a control and eradication program of the EBL, with low prevalence rates, the ELISA will present better performance, by having greater sensitivity, avoiding the permanence disseminators of the disease in herds.

Keywords: Bovines, BLV, immunodiffusion, serology.

INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença transmissível, cosmopolita e de evolução crônica, de natureza infectocontagiosa, causada pelo Vírus da Leucose Bovina (VLB), um Deltarretrovírus exógeno linfotrópico B, que compromete primariamente o sistema linfoide do bovino infectado, especialmente linfonodos, que podem ser progressivamente substituídos por tecido de natureza neoplásica, podendo causar ou não leucemização (Melo, 1991; Leite et al., 2001; OIE, 2012; Frie; Coussens, 2015).

Sabe-se, com a realização de estudos prévios, que a LEB atua como fator de risco para a ocorrência de enfermidades oportunistas, com destaque para a tuberculose bovina, sendo a intercorrência entre as duas doenças registrada em diversas situações (Melo, 1999; Melo et al., 2010; Fernandes et al., 2011; Mendes et al., 2011; Frie; Coussens, 2015), demandando atenção ainda maior de pesquisadores e autoridades sanitárias.

A LEB é associada a grandes perdas econômicas e estudos a cerca de sua prevalência demonstram sua ampla distribuição em rebanhos leiteiros brasileiros, sobretudo em Pernambuco, com alarmante prevalência de 24%, considerada a maior da região Nordeste, o que caracteriza o estado de enzootia no qual se encontram os rebanhos do estado (Fernandes et al., 2011).

A situação epidemiológica da LEB no Brasil vem motivando estudos para o aprimoramento do diagnóstico da mesma, tendo como base as técnicas sorológicas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE): a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) (El-Hafeiz et al., 2010; Dias et al., 2012; Tirziu et al., 2014; Maresca et al., 2015).

O ELISA possui algumas vantagens quando comparada a IDGA no diagnóstico da LEB, como o resultado em um menor tempo para realização do teste e a possibilidade da avaliação de pools sorológicos no monitoramento de rebanhos. Além disso, o mesmo destaca-se pela elevada sensibilidade possibilitando a identificação de animais com baixa titulação sérica de anticorpos (Brenner et al., 1994; Trono et al., 2001; EL-Hafeiz et al., 2010; Thrusfield, 2013; Tirziu et al., 2014). Estes benefícios estão levando alguns países a substituir a IDGA pelo ELISA em seus programas de erradicação (Mammerickx et al., 1985; Klintevall et al., 1991; Gibson, 1995; Maresca et al., 2015).

Considerando-se a relevância da LEB nos rebanhos do estado de Pernambuco, objetivou-se avaliar comparativamente o kit ELISA CHEKIT-*Leucose-serum* (IDEXX®) com a IDGA em bovinos leiteiros naturalmente infectados pelo VLB.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados no estudo 327 bovinos leiteiros, em idade produtiva, oriundos de rebanhos localizados em municípios da Região Metropolitana do Recife, Zona da Mata, Agreste e Sertão pernambucano, escolhidos por conveniência.

Para a realização do sorodiagnóstico da LEB foram colhidas amostras de sangue por venopunção jugular em tubos sem anticoagulante e processadas no Laboratório Clínico de Animais de Produção da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LACAP/UFRPE) para obtenção do soro e posterior armazenamento a - 20° C.

O teste imunoenzimático foi realizado utilizando o kit comercial importado ELISA CHEKIT-*Leucose-serum* produzido pelo laboratório IDEXX®, sendo aplicadas as recomendações do fabricante. As leituras das microplacas foram realizadas em leitor *Thermo® Multiskan*, ajustado com filtro de 450nm.

Para a realização da imunodifusão em gel ágar, foi utilizada a técnica da Imunodifusão Radial Dupla de *Ouchterlony* (Miller; Van der Maaten, 1977).

De forma a homogeneizar os grupos amostrais foram desconsideradas as amostras inconclusivas a um ou ambos os testes. Os resultados foram avaliados estatisticamente quanto à sensibilidade e especificidade do ELISA e concordância entre os dois testes (Kappa), considerando a IDGA como a técnica padrão (Thrusfield, 2013).

O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob licença número 010/2013.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostragem foi definida com 302 amostras, tendo em vistas que 25 foram desconsideradas por apresentarem resultados inconclusivos, seis ao ELISA e 19 à IDGA.

Com relação ao ELISA, 45% das amostras reagiram positivamente (136/302), enquanto que na IDGA foram observados 24,1% de amostras positivas (73/302). Das 73 amostras consideradas positivas à IDGA, apenas uma (1,36%) não foi detectada também pelo ELISA (Tab. 1).

Tabela 1. Associação dos resultados da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina em bovinos leiteiros naturalmente infectados criados no estado de Pernambuco.

		IDGA		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA	Positivo	72	64	136
	Negativo	1	165	166
	Total	73	229	302

$Kappa = 0.55$

Desta forma, com o ELISA foi possível identificar como sororreagentes 64 amostras que não haviam sido identificadas na IDGA. A identificação dos animais reagentes ao ELISA, que não foram identificados pela IDGA, deve-se, provavelmente, à elevada sensibilidade do teste, que possibilita a identificação de anticorpos mesmo em situações com baixos teores séricos (Brenner et al., 1994; Trono et al., 2001; El-Hafeiz et al., 2010; Thrusfield, 2013; Tirziu et al., 2014).

Reações falso-negativas na IDGA, associadas aos baixos teores séricos de anticorpos, podem ser comumente observadas em situações como infecções incipientes, quando ainda não houve a soroconversão, e no período pré e pós-parto, quando há o recrutamento das imunoglobulinas para a produção do colostro, diminuindo o nível sérico das mesmas. Nesse contexto, a incidência de animais falso-negativos alerta à necessidade de estudos mais aprofundados acerca da confirmação destes resultados, e dos impactos destes resultados no controle da LEB em rebanhos leiteiros, principalmente no que concerne à consequência da manutenção desses animais em um rebanho (Flores et al., 1989; Tsutsui et al., 2016).

Ao analisar os resultados do ELISA, de forma comparada à IDGA, técnica já consolidada e considerada padrão, foi constatada uma sensibilidade de 98,6% e uma especificidade de 72%. O índice Kappa encontrado foi de 0.55, sendo a concordância considerada “substancial” (Thrusfield, 2013).

A especificidade do kit ELISA ressalta a necessidade de ajustes, de forma a elevar a mesma, e de estudos *in vitro* que possibilitem o acompanhamento de animais sabidamente positivos e negativos, para elucidar questionamentos acerca de resultados falso-negativos e positivos. A concordância entre os testes foi considerada substancial provavelmente, pela maior capacidade de detecção do ELISA (Brenner et al., 1994;

Trono et al., 2001; El-Hafeiz et al., 2010; Thrusfield, 2013; Tirziu et al., 2014), gerando discordância entre os testes.

O resultado encontrado demonstra ainda a importância do uso de ambos os testes (ELISA e IDGA) em diferentes situações epidemiológicas da LEB, considerando que em uma fase de elevadas prevalências a IDGA, por sua elevada especificidade (Mille & Van der Maaten, 1977; Martin et al., 2001) terá melhor eficiência, e em momento posterior o ELISA seria aplicado, inserido em uma situação com um maior controle e menores prevalências, pela sua elevada sensibilidade.

CONCLUSÕES

O kit ELISA CHEKIT-Leucose-serum (IDEXX®) demonstra valores de sensibilidade, especificidade e concordância satisfatórios, principalmente em relação à sensibilidade, porém há a necessidade de estudos comparativos com testes de maior especificidade, com o objetivo de esclarecer possíveis casos de falso-positivos e negativos.

Apesar da IDGA se mostrar até o momento um teste eficiente, em etapas mais avançadas de um programa de controle e erradicação da LEB, com baixos índices de prevalência, o ELISA apresentará melhor rendimento, por possuir maior sensibilidade, evitando-se a permanência animais disseminadores da doença nos rebanhos.

REFERÊNCIAS

BRENNER, J.; MOSS, S.; MOALEM, U. A comparative study of the Elisa and AGID techniques for the detection of bovine leucosis virus antibodies in bovine serum and milk. *Israel J. Vet. Med.*, v.49, p.165-67, 1994.

DIAS, N. L.; FONSECA JÚNIOR, A.; RODRIGUES, D. S.; CAMARGOS, A. F. PCR em tempo real para diagnóstico da leucose enzoótica bovina. *Ciência Rural*, v.42, p.1434-39, 2012.

EL-HAFEIZ, Y. G. M.; METIAS, K. N.; ABRAHIM, I. G. A. Comparative Serological Detection of Enzootic Bovine Leukosis Virus (EBLV) in cattle sera. *Global Vet*, v.4, n.3, p.267-270, 2010.

FERNANDES, A. C. C., TENÓRIO, T. G. S.; SILVA, T. I. B.; MENDES, E. I.; BAPTISTA FILHO, L. C. F.; MELO, L. E. H. Leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos: estudo retrospectivo e prospectivo da ocorrência em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. *Veterinária e Zootecnia*, v.18, n.4, Supl. 3, 2011.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R., PEREIRA, N. M.; PORTOLANN, J. A. B.; SANCHEZ, C. M.; SOARES, M. R. L. Utilização da Imunodifusão em gel ágar (IDGA) no controle da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB). *Ciência Rural*, v.19, p.169-176, 1989.

FRIE, M. C.; COUSSENS, P. M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 163, n. 3, p. 103-114, 2015.

GIBSON, L. A. Testing for enzootic bovine leukosis. *Vet. Rec.* v.136, n.6, p.156, 1995.

KLINTEVALL, K.; NASLUND, K.; SVEDLUND, G.; HAJDU, L.; LINDE, N.; KLINGEBORN, B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukemia virus in milk and serum. *J. Virol. Met.*, v.33, n.3, p.319-333, 1991.

MAMMERICKX, M. The immunodiffusion tests for the detecion of bovine leukemia virus infected animais. *Martinus Nijhoff*, p.195-200, 1987.

MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples. *Zbl. Vet. Med. B*, v.32, p.526-533, 1985.

MARESCA, C.; COSTARELLI, S.; DETTORI, A.; FELICI, A.; ISCARO, C.; FELIZIANI, F. Enzootic bovine leukosis: Report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005–2012). *Preventive veterinary medicine*, v. 119, n. 3, p. 222-226, 2015.

MARTIN, D.; ARJONA, A.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; VIANA, M.; GOÂ MEZ-LUCIÂ E. Comparative Study of PCR as a Direct Assay and ELISA and AGID as Indirect Assays for the Detection of Bovine Leukaemia Virus. *J. Vet. Med.*, v.48, p.97-106, 2001.

MELO, L. E. H. Avaliação da Intercorrência entre Leucose Enzoótica, Tuberculose e Leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo. USP, 1999, São Paulo – Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

MELO, L. E. H.; FERNANDES, A. C. C.; SILVA, T. I. B.; TENÓRIO, T. G. S.; MENDES, E. I.; BAPTISTA FILHO, L. C. F. Estudo retrospectivo e prospectivo da intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. *In: Seminário Nacional Sobre Brucelose e Tuberculose Animal (SNBTA)*. 2010. Belo Horizonte; 2010.

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.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur J Cancer*, v.13, p.1369-75, 1977.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. Código Zoosanitário Internacional.[base de dados da Internet]. 2012. [acesso em: 2015 Nov 15]. Disponível em: <http://www.oie.int>.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 3th ed. Elsevier; 2013.

TIRZIU, E.; CUMPĂNĂȘOIU, C.; NICHITA, I.; REMAN, G. D.; SONEA, C.; ȘERES, M. Performance assessment of three tests applied in enzootic bovine leukosis diagnosis. *Rom Biotech Letters*, v.19, p. 9666-9677, 2014.

TRONO, K. G. et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol*, v.83, p.235-248, 2001.

5.2 Artigo 2 - USO SIMULTÂNEO DO TESTE DA TUBERCULINA E DO ELISA PARA O DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA TUBERCULOSE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Revista: Pesquisa Veterinária Brasileira.

Uso simultâneo do teste da tuberculina e do ELISA para o diagnóstico e controle da tuberculose bovina em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco¹

Luiz C.F. Baptista Filho^{2*}, Artur C.C. Fernandes³, Tamyres I.B. Silva⁴ e Lúcio E.H. Melo³

ABSTRACT.- Baptista Filho L.C.F., Fernandes A.C.C., Silva T.I.B. & Melo L.E.H. 2016. [**Simultaneous use of tuberculin test and ELISA for the diagnosis and control of bovine tuberculosis in dairy cattle of the state of Pernambuco**] Uso simultâneo do teste da tuberculina e do ELISA para o diagnóstico e controle da tuberculose bovina em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF Sertão) – Campus Santa Maria da Boa Vista, Brasil. Rua Doutor Souza Filho, s/n, Santa Maria da Boa Vista, PE 56380-000 *Autor para correspondência: luiz.baptista@ifsertao-pe.edu.br

In view of the continuing need to increase the effectiveness of diagnostic tools for control and eradication of tuberculosis programs aimed to with the work was to evaluate the use of ELISA in the control of bovine tuberculosis in dairy cattle raised in Pernambuco. Was used 379 cattle from dairy herds in the state of Pernambuco, which were tested for compared cervical tuberculin test (CTT) and serology for identification of anti-*Mycobacterium bovis* antibodies, using the ELISA IDEXX® *M. bovis* Ab Test kit. Of 379 bovine animals tested, 32 (4.2%) were positive to CTT and 10 (2.6%) to ELISA. None of the positive cattle to CTT was positive to the ELISA. The results of this study showed that in a sanitation program, is recommend the simultaneous use of the two tests, since 10 negative animals to CTT were detected by ELISA, allowing the disposal of 26 potentially infected cattle and disseminators of the disease. It is concluded that the ELISA used simultaneously to CTT enhances sanitation of dairy herds in the state of Pernambuco, eliminating animals that serve as a source of infection and shortening the bovine tuberculosis-free herd certification time.

INDEX TERMS: Bovine, serology, *Mycobacterium bovis*.

RESUMO.- Tendo em vista a continuada necessidade de se aumentar a eficácia de ferramentas diagnósticas em programas de controle e erradicação da tuberculose, objetivou-se com o trabalho avaliar o uso do ELISA no controle da tuberculose bovina em rebanhos leiteiros criados em Pernambuco. Foram utilizados no estudo 379 bovinos que foram submetidos ao teste da tuberculina cervical comparado (TCC) e à sorologia, para identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium bovis*, com o uso do kit ELISA IDEXX® *M. bovis* Ab Test. Dos 379 bovinos examinados, 16 (4,2%) apresentaram positividade ao TCC e 10 (2,6%) ao ELISA. Nenhum dos bovinos positivos ao TCC resultou positivo ao ELISA. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que, em um programa de saneamento, é recomendável o uso simultâneo dos dois testes, uma vez que 10 animais negativos ao TCC foram detectados pelo ELISA, possibilitando o descarte de 26 bovinos potencialmente infectados e disseminadores da doença. Conclui-se que o ELISA usado simultaneamente ao TCC potencializa o saneamento dos rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco, eliminando animais que serviriam como fonte de infecção e abreviando o tempo de certificação de rebanho livre de tuberculose bovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovino, sorologia, *Mycobacterium bovis*.

INTRODUÇÃO

A Tuberculose Bovina (TB) é uma enfermidade causada pelo bacilo *Mycobacterium bovis*, caracterizada pela evolução crônica e caráter oportunista da infecção, responsável por emagrecimento progressivo, aumento de volume de linfonodos por todo o corpo e presença de

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF Sertão) – Campus Santa Maria da Boa Vista, Brasil. Rua Doutor Souza Filho, s/n, Santa Maria da Boa Vista, PE 56380-000 *Autor para correspondência: luiz.baptista@ifsertao-pe.edu.br

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil.

⁴ Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre (UFAC), BR 364, Km 4, s/n, Distrito Industrial, Rio Branco, AC 69915-900, Brasil.

proliferações nodulares granulomatosas, podendo acometer diversos órgãos (Roxo 1996, Cosive et al. 1998, Dirksen & Gründer 2005, Radostits et al. 2007).

A doença possui distribuição cosmopolita, porém sua difusão é maior em países em desenvolvimento, especialmente quando as criações são submetidas a um manejo mais intensivo e falho em seus aspectos sanitários, condições estas que acarretam queda na produtividade e condenação de carcaças em matadouros, gerando grandes prejuízos (Cosive et al. 1998, Radostits et al. 2007).

A situação da enfermidade no estado de Pernambuco é preocupante, uma vez que estudo recente demonstrou incidência de 11% (99/920) de bovinos infectados e de 44,8% dos rebanhos (13/29) estudados apresentando pelo menos um animal positivo (Fernandes et al. 2011).

A baixa acurácia das ferramentas auxiliares tem sido implicada como um dos principais entraves em programas de controle e erradicação da enfermidade (Shiller et al. 2010). Estas ferramentas, complementares ao exame clínico, incluem técnicas como a prova tuberculínica, exames anatomopatológicos, biomoleculares, bacteriológicos e sorológicos, possuindo grande importância por ser comum entre os bovinos a presença de portadores assintomáticos (Radostits et al. 2007, Schiller et al. 2010, De Paula Júnior et al. 2011, Waters et al. 2011, Casal et al. 2014).

No Brasil, o teste da tuberculina é preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o diagnóstico da doença e se baseia na resposta imune mediada por células (RIMC) e classificada como reação de hipersensibilidade retardada do tipo IV (Brasil 2006). Contudo, sabe-se que parte dos animais tuberculinizados, embora infectados, resultam negativos, como demonstrado em estudo recente em que 24,3% (768/3161) tuberculinizados somente foram identificados como infectados no exame post-mortem (Álvarez et al. 2014).

Embora se saiba que a RIMC tenha papel relevante na TB (Lyashchenko et al. 1998, Pollock & Neill 2002), bovinos submetidos a diferentes situações fisiopatológicas, como infecção em estágio avançado, doenças intercorrentes, estresse associado ao parto, desnutrição, exaustão e transporte (Maunder 1948, Kleeberg 1960, Álvarez et al. 2014) podem reduzir o grau de resposta ao teste tuberculínico e, conseqüentemente, possibilitar aparecimento de resultados falso-negativos em alguns rebanhos. Neste sentido, é crescente a ideia de que um único método diagnóstico é incapaz de detectar todos os animais infectados de um rebanho, sendo necessária para isso a utilização combinada de mais de um teste (Salfinger & Pfyffer 1994, WHO 1994; Lilenbaum & Fonseca 2006, Jeon et al. 2010, Medeiros et al. 2010, Waters et al. 2011, Casal et al. 2014).

No estágio mais avançado da doença, admite-se que a resposta humoral, caracterizada pela produção de anticorpos específicos pelos linfócitos B (Adams 2001, Pollock & Neill 2002), é a base do sorodiagnóstico por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Lilenbaum & Fonseca 2006, Jeon et al. 2010, Waters et al. 2011). A elaboração de um kit ELISA mais acurado para a detecção de anticorpos anti-*M. bovis* tem sido considerada por alguns autores uma tarefa árdua (Shiller et al. 2010). Os estudos geralmente apontam baixa sensibilidade dos kits, fato que exige o seu uso em conexão com técnicas baseadas na RIMC (Ruggiero et al. 2007, Fráguas et al. 2008, Waters et al. 2011, Casal et al. 2014).

Tendo em vista a continuada necessidade de se aumentar a eficácia de ferramentas diagnósticas em programas de controle e erradicação da tuberculose, objetivou-se com o trabalho avaliar o uso do ELISA no diagnóstico e controle da tuberculose bovina em rebanhos leiteiros de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados no estudo 379 bovinos leiteiros, em idade produtiva, oriundos de 12 rebanhos localizados em municípios da Região Metropolitana do Recife, Zona da Mata, Agreste e Sertão pernambucano, escolhidos por conveniência.

Os animais foram tuberculinizados pela técnica cervical comparada (TCC), segundo protocolo estabelecido pelo MAPA (Brasil 2006), fazendo-se uso das proteínas purificadas derivadas do *Mycobacterium avium* e do *Mycobacterium bovis*. Simultaneamente, amostras de sangue foram colhidas por venopunção jugular em tubos sem anticoagulante e processadas no Laboratório Clínico de Animais de Produção da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LACAP/UFRPE) para obtenção do soro e armazenadas a -20°C.

O sorodiagnóstico foi realizado mediante o uso do kit ELISA IDEXX® *M. bovis* Ab Test, seguindo-se recomendações do fabricante, previamente padronizadas por Waters et al. (2011), baseado na detecção de anticorpos específicos anti-*M. bovis* contra duas proteínas presentes no bacilo: a MPB83 e MPB70 (Waters et al. 2011). As leituras das microplacas foram realizadas em

leitor Thermo® Multiskan, ajustado com filtro de 450nm. Os resultados foram analisados estatisticamente de forma descritiva.

O estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob licença número 010/2013.

RESULTADOS

Dos 379 bovinos examinados, 16 (4,2%) foram positivos no TCC e 10 (2,6%) no ELISA. Nenhum dos bovinos positivos no TCC resultou positivo ao ELISA (Tab. 1). As discrepâncias de resultados observadas entre os dois testes podem ser explicadas pelo fato de que o TCC detecta a RIMC, fenômeno biológico observado mais precocemente, enquanto que o ELISA identifica a resposta mediada por anticorpos mais tardiamente (Adams 2001, Pollock & Neill 2002). Porém, outros estudos comparativos evidenciaram concordância de resultados, ainda que baixa, entre os dois testes (Lilenbaum & Fonseca 2006, Casal et al. 2011, Waters et al. 2011, Casal et al. 2014), em decorrência, provavelmente, do uso da tuberculinização simples, considerado um teste de menor especificidade do que o utilizado neste estudo (TCC), o que possibilitou a detecção de um maior contingente de bovinos reagentes e, conseqüentemente, a intersecção de resultados.

Adicionalmente, esta convergência de resultados pode estar associada a uma fase imunológica de transição, presente nos bovinos reagentes aos dois testes, caracterizada pela ocorrência simultânea das respostas imunes mediada por células, identificada pelo TCC, e humoral, pelo ELISA (Pollock & Neill 2002, Waters et al. 2010).

Estudos associados à presença de animais negativos ao teste da tuberculina e positivos em outros testes diagnósticos têm sido relatados. A permanência desses animais em seus rebanhos de origem poderiam servir como fonte de infecção para novos casos. Neste sentido, Lilenbaum e Fonseca (2006) realizaram estudo em que animais negativos ao teste tuberculínico foram detectados pelo ELISA, sendo a positividade confirmada pelos exames anatomopatológicos. Em outro estudo, realizado por Casal et al. (2011), em que foi usado o mesmo kit deste experimento, foram identificados quatro bovinos não detectados pelo teste tuberculínico em 56 animais sabidamente infectados por *M. bovis*.

Ruggiero et al. (2007), Fráguas et al. (2008), Waters et al. (2011) e Casal et al. (2014) não recomendam a utilização do ELISA de forma isolada para o diagnóstico da TB, sugerindo o seu uso em conexão com uma ferramenta baseada na RIMC. O uso de testes paralelos, portanto, é uma estratégia relatada para se aumentar a capacidade de detecção em diferentes situações (Thrusfield 2007).

O diagnóstico de uma enfermidade infecciosa pode ser potencializado pelo uso de duas ou mais técnicas, sendo esta estratégia recomendada em programas de controle e erradicação de doenças infecciosas, principalmente em locais com baixa prevalência, visto que a possibilidade da manutenção desses animais como fonte de infecção no rebanho é quase anulada (Lillenbaum & Fonseca 2006).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que, em um programa de saneamento, é recomendável o uso simultâneo dos dois testes, uma vez que 10 animais negativos ao TCC foram detectados pelo ELISA, possibilitando o descarte de 26 bovinos potencialmente infectados e disseminadores da doença. Esses bovinos que apresentaram positividade ao ELISA são prováveis portadores de lesões características da tuberculose (Lilenbaum & Fonseca 2006, Casal et al. 2011, Waters et al. 2011).

O controle da tuberculose pode ser efetivo mediante a tuberculinização em mais três testes sucessivos dos bovinos negativos ao TCC e ao ELISA (Fig. 1), em conformidade com o PNCEBT (Brasil, 2006). Porém, não se recomendada o uso do ELISA em etapas mais avançadas de um programa de saneamento, visto que praticamente todos os bovinos infectados já teriam sido eliminados do rebanho com uso simultâneo dos dois testes, além da possível influência do TCC no ELISA resultando na identificação de falsos positivos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o kit ELISA, utilizado simultaneamente ao TCC potencializa o saneamento dos rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco, eliminando animais que serviriam como fonte de infecção e abreviando o tempo de certificação do rebanho como livre da tuberculose bovina.

Agradecimentos.- Agradecemos à Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio às atividades do grupo de pesquisa, em especial ao Laboratório de Vírus do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, ao CNPq e Capes, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Adams L.G. 2001. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics). 20(1): 304-324.
- Álvarez J., Perez A., Marqués S., Bezos, J., Grau A., de la Cruz M.L., Romero B., Saez J.L., Esquivel M.L., Martínez M.C., Mínguez O., Juan L. & Domínguez L. 2014. Risk factors associated with negative in-vivo diagnostic results in bovine tuberculosis-infected cattle in Spain. *BMC Veterinary Research*. 10(1): 14.
- Brasil. 2006. Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF.
- Casal C., Bezos J., Romero B., Díez A., Alvarez J., Rodriguez-Campos S., de Juan L., Mateos A., Linscott R., Martel E., Lawrence J., Aranaz A. & Dominguez L. Evaluation of a serological assay for the detection of bovine tuberculosis. In: *Anais do 15. Animal Health and the Veterinary Laboratories Agency (AHVLA) International Conference; 2011; London, England*. London: Animal Health and the Veterinary Laboratories Agency; 2011.
- Casal C., Díez-Guerrier A., Álvarez J., Rodriguez-Campos 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. *Veterinary microbiology*. 170(3):342-351.
- Cosivi, O., Grange, J. M., Daborn, C. J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F., Kantor I. & Meslin F.X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging infectious diseases*, 4(1): 59.
- De Paula Junior A. R., Silva T.I.B., Fernandes A.C.C., Baptista Filho L.C.F., Souza A.C.M., Maia F.C.L., Ramos C.A.N., Araújo F.R. & Melo L.E.H. 2011. Identificação Biomolecular do *Mycobacterium bovis* em Bovino Leiteiro Criado na Mesorregião Metropolitana do Recife, Pernambuco. *Veterinária e Zootecnia*. 18(4):Supl.3:835-838.
- Dirksen G., Gründer H.D. *Medicina interna y cirugía del bovino*. 4. ed. Buenos Aires: Inter-Médica, 2005.
- Fernandes A.C.C., Tenório T.G.S., Silva T.I.B., Mendes E.I., Baptista Filho L.C.F. & Melo L.E.H. 2011. Leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos: estudo retrospectivo e prospectivo da ocorrência em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. *Veterinária e Zootecnia*. 18(4): Supl.3:728-732.
- Fráguas S., Cunha-Abreu M.S., Ferreira A.M.R., Marassi C.D., Oelemann W., Fonseca L.S., Ferreira R. & Lilenbaum W. 2008. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 15(3):117-121.
- Jeon B. Y., Kim S.C., Je S., Kwak J., Cho J.E., Woo J.T., Seo S., Shim H., Park B., Lee S. & Cho, S. N. 2010. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using milk samples as a potential screening test of bovine tuberculosis of dairy cows in Korea. *Research in veterinary science*, 88(3):390-393.
- Kleeberg H.H. 1960. The tuberculin test in cattle. *Journal of South African Veterinary Medical Association*. 31:213-225.
- Lilenbaum W. & Fonseca L.S. O uso de Elisa como ferramenta complementar para o controle da tuberculose bovina no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 43(2):256-261.
- Lyashchenko K.P., Pollock J.M., Colgangel R. & Gennaro M.L. 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infection and immunity*. 66(11):5344-5349.
- Maunder J.C.J. 1948. The control of tuberculosis in Queensland. *Australian Veterinary Journal*. 24:313-319.
- Medeiros L., Marassi C.D., Figueiredo E. & Lilenbaum W. 2010. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:531-541.
- Pollock J.M. & Neill S.D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*. 163(2):115-127.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007.
- Roxo E. 1996. Tuberculose bovina: Revisão. (Bovine Tuberculosis: review). *Arquivos do Instituto Biológico*. 63(2):91-97.

- Ruggiero A.P., Ikuno A.A., Ferreira V.C. A. & Roxo E. 2007. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. *Arquivos do Instituto Biológico*. 74(1):55-65.
- Salfinger M. & Pfyffer G.E. 1994. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 13(11):961-979.
- 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. *Transboundary and emerging diseases*. 57(4):205-220.
- Thrusfield, M. *Veterinary epidemiology*. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 2007.
- Waters W.R., Buddle B.M., Vordermeier H.M., Gormley E., Palmer M.V., Thacker T.C., Bannantine J.P., Stabel 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. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18(11):1882-1888.
- Waters W.R., Whelan A.O., Lyashchenko K.P., Greenwald R., Palmer M.V., Harris, B.N., Hewinson R.G. & Vordermeier, H.M. 2010. Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(2):247-252.

Legendas das Figuras

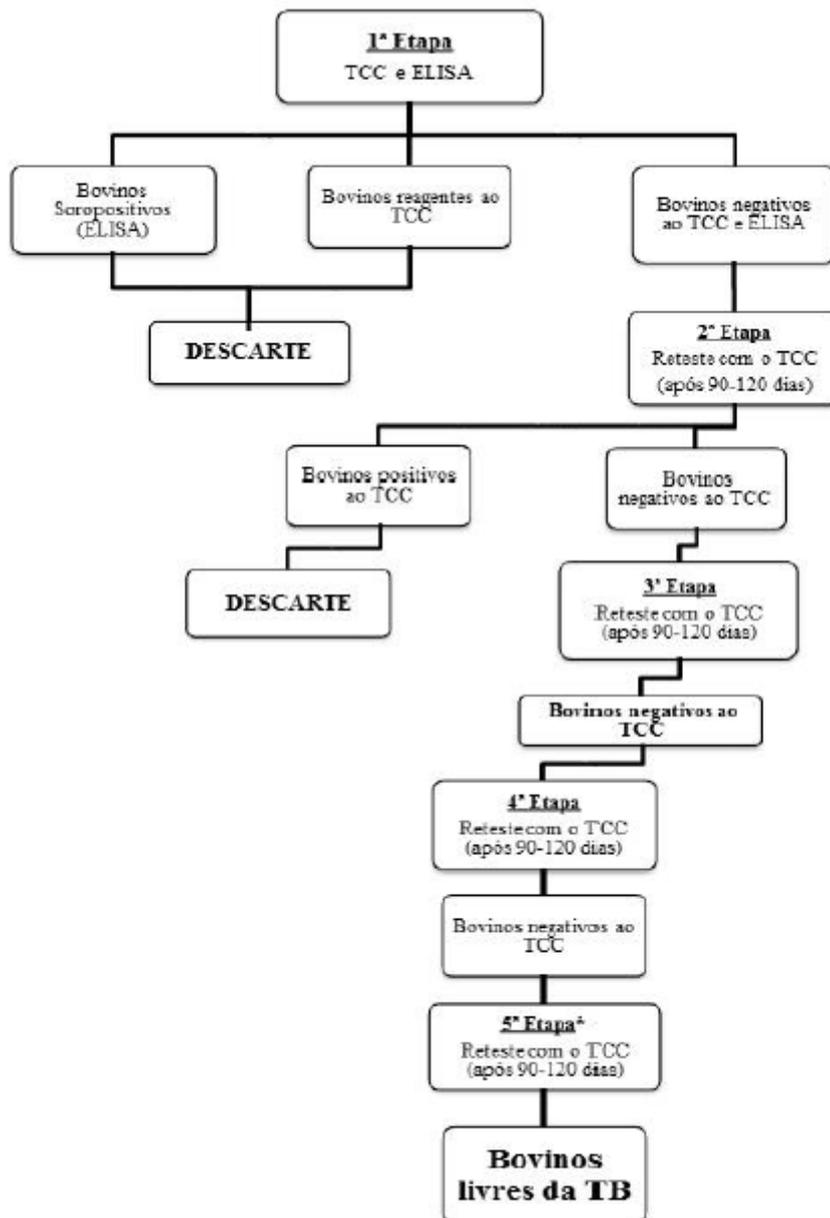
- Fig. 1. Esquema representativo de programa de saneamento de rebanho com o uso simultâneo do teste cervical comparado (TCC) e o ELISA para o diagnóstico e controle da tuberculose bovina. *Os rebanhos deverão apresentar três resultados negativos consecutivos de todos os animais testados no rebanho para ser certificado como livre da tuberculose bovina. Recife, 2016.

Os Quadros

Quadro 1. Bovinos leiteiros positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC) ou ao ELISA criados no estado de Pernambuco

Rebanho	Animal	Resultado TCC	Resultado ELISA
2	1	Positivo	Negativo
	22	Positivo	Negativo
	44	Negativo	Positivo
4	6	Negativo	Positivo
	11	Negativo	Positivo
5	14	Negativo	Positivo
7	5	Negativo	Positivo
	10	Positivo	Negativo
	13	Positivo	Negativo
9	23	Positivo	Negativo
	28	Positivo	Negativo
	33	Positivo	Negativo
	38	Negativo	Positivo
12	4	Positivo	Negativo
	7	Positivo	Negativo
	9	Positivo	Negativo
	18	Negativo	Positivo
	20	Positivo	Negativo
	23	Positivo	Negativo
	24	Positivo	Negativo
	25	Negativo	Positivo
	40	Positivo	Negativo
	41	Positivo	Negativo
	43	Inconclusivo	Positivo
	50	Positivo	Negativo
62	Inconclusivo	Positivo	
Total	26	16	10

Figura 1



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As situações epidemiológicas da LEB e da TB em Pernambuco são preocupantes, demandando maior atenção dos órgãos de vigilância animal do estado;
- O uso do ELISA pode auxiliar o controle das enfermidades em questão, aumentando a eficácia dos programas saneamentos dos rebanhos;
- O ELISA pode substituir a IDGA no diagnóstico da LEB, especialmente em etapas mais avançadas em programas de controle e erradicação da doença;
- Em relação à TB, o ELISA se presta para uso simultâneo com o teste da tuberculina para a detecção de animais em diferentes fases da resposta imunológica ao *Mycobacterium bovis*: mais precocemente, pelo teste tuberculina, associado à resposta imune do tipo celular; ou tardiamente, pelo ELISA, na resposta humoral.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados de ELISA Idexx® CHEKIT LEUCOSE SERUM X IDGA



Resultados de ELISA Idexx® CHEKIT LEUCOSE SERUM X IDGA
Responsável: Luiz Carlos Fontes Baptista Filho – CRMV-PE: 3745



Placa	Rebanho	Animal	OD 1	OD 2	OD Média	Valor (%)	Resultado ELISA	Resultado IDGA
1	R-1	1	0,19	0,185	0,1875	8,887190083	Negativo	Negativo
		2	2,399	2,252	2,3255	222,6871901	Positivo	Inconclusivo
		3	2,717	2,732	2,7245	262,5871901	Positivo	Negativo
		4	2,895	2,878	2,8865	278,7871901	Positivo	Positivo
		5	2,009	2,032	2,0205	192,1871901	Positivo	Positivo
		6	0,479	0,418	0,4485	34,98719008	Inconclusivo	Negativo
		7	3,187	3,267	3,227	312,8371901	Positivo	Positivo
		8	3,168	3,128	3,148	304,9371901	Positivo	Positivo
		9	1,88	1,672	1,776	167,7371901	Positivo	Negativo
		10	3,17	3,265	3,2175	311,8871901	Positivo	Inconclusivo
	11	3,261	3,334	3,2975	319,8871901	Positivo	Positivo	
	R-2	1	0,644	0,621	0,6325	53,38719008	Positivo	Negativo
		2	1,212	0,877	1,0445	94,58719008	Positivo	Positivo
		3	1,65	1,862	1,756	165,7371901	Positivo	Inconclusivo
4		1,538	1,633	1,5855	148,6871901	Positivo	Negativo	

		5	2,269	2,08	2,1745	207,5871901	Positivo	Positivo
		6	0,094	0,092	0,093	-0,562809917	Negativo	Negativo
		7	0,16	0,166	0,163	6,437190083	Negativo	Negativo
		8	1,455	1,434	1,4445	134,5871901	Positivo	Negativo
		9	0,121	0,116	0,1185	1,987190083	Negativo	Negativo
		10	0,186	0,178	0,182	8,337190083	Negativo	Negativo
		11	0,137	0,146	0,1415	4,287190083	Negativo	Negativo
		12	3,233	3,413	3,323	322,4371901	Positivo	Inconclusivo
		13	3,094	2,878	2,986	288,7371901	Positivo	Negativo
		14	2,579	4,462	3,5205	342,1871901	Positivo	Negativo
		15	1,148	1,219	1,1835	108,4871901	Positivo	Inconclusivo
		16	0,128	0,127	0,1275	2,887190083	Negativo	Negativo
		17	0,105	0,239	0,172	7,337190083	Negativo	Negativo
		18	0,133	0,13	0,1315	3,287190083	Negativo	Negativo
		19	2,319	2,362	2,3405	224,1871901	Positivo	Negativo
		20	0,138	0,134	0,136	3,737190083	Negativo	Negativo
		21	0,183	0,188	0,1855	8,687190083	Negativo	Negativo
		22	2,495	2,573	2,534	243,5371901	Positivo	Positivo
		23	2,089	2,043	2,066	196,7371901	Positivo	Negativo
		24	2,62	2,337	2,4785	237,9871901	Positivo	Positivo
		25	1,262	1,233	1,2475	114,8871901	Positivo	Negativo
		26	0,05	0,109	0,0795	-1,912809917	Negativo	Negativo

	27	1,091	1,026	1,0585	95,98719008	Positivo	Inconclusivo
	28	0,081	0,112	0,0965	-0,212809917	Negativo	Negativo
	29	0,722	0,672	0,697	59,83719008	Positivo	Inconclusivo
	30	0,163	0,183	0,173	7,437190083	Negativo	Negativo
	31	0,124	0,124	0,124	2,537190083	Negativo	Negativo
	32	0,091	0,093	0,092	-0,662809917	Negativo	Negativo
	33	1,737	1,707	1,722	162,3371901	Positivo	Inconclusivo
	34	1,745	0,72	1,2325	113,3871901	Positivo	Inconclusivo
	35	0,084	0,128	0,106	0,737190083	Negativo	Negativo
	36	0,071	0,083	0,077	-2,162809917	Negativo	Negativo
2	37	0,183	0,261	0,222	9,840837696	Negativo	Negativo
	38	1,226	1,492	1,359	123,5408377	Positivo	Positivo
	39	0,133	0,131	0,132	0,840837696	Negativo	Negativo
	40	3,06	2,942	3,001	287,7408377	Positivo	Positivo
	41	3,143	2,818	2,9805	285,6908377	Positivo	Negativo
	42	0,125	0,13	0,1275	0,390837696	Negativo	Negativo
	43	0,114	0,115	0,1145	-0,909162304	Negativo	Negativo
	44	3,13	2,911	3,0205	289,6908377	Positivo	Positivo
	45	0,102	0,105	0,1035	-2,009162304	Negativo	Negativo
	46	0,103	0,105	0,104	-1,959162304	Negativo	Negativo
	47	1,491	1,345	1,418	129,4408377	Positivo	Negativo
	48	0,112	0,111	0,1115	-1,209162304	Negativo	Negativo

		49	0,101	0,107	0,104	-1,959162304	Negativo	Negativo
		50	1,699	1,774	1,7365	161,2908377	Positivo	Positivo
		51	0,08	0,082	0,081	-4,259162304	Negativo	Negativo
		52	0,082	0,081	0,0815	-4,209162304	Negativo	Negativo
		53	2,939	3,073	3,006	288,2408377	Positivo	Positivo
		54	0,223	0,218	0,2205	9,690837696	Negativo	Negativo
		55	1,876	1,913	1,8945	177,0908377	Positivo	Positivo
		56	0,072	0,069	0,0705	-5,309162304	Negativo	Negativo
		57	0,221	0,252	0,2365	11,2908377	Negativo	Negativo
		58	0,095	0,086	0,0905	-3,309162304	Negativo	Negativo
		59	0,127	0,112	0,1195	-0,409162304	Negativo	Negativo
		60	2,071	1,936	2,0035	187,9908377	Positivo	Positivo
		61	2,145	1,985	2,065	194,1408377	Positivo	Positivo
		62	0,122	0,118	0,12	-0,359162304	Negativo	Negativo
		63	3,008	3,227	3,1175	299,3908377	Positivo	Positivo
		64	3,308	2,072	2,69	256,6408377	Positivo	Positivo
		65	1,695	1,672	1,6835	155,9908377	Positivo	Inconclusivo
		66	1,723	1,767	1,745	162,1408377	Positivo	Positivo
		67	1,462	1,323	1,3925	126,8908377	Positivo	Inconclusivo
		68	1,576	2,771	2,1735	204,9908377	Positivo	Positivo
		69	2,368	2,345	2,3565	223,2908377	Positivo	Positivo
	R-3	1	0,097	0,093	0,095	-2,859162304	Negativo	Negativo

		2	0,113	0,098	0,1055	-1,809162304	Negativo	Negativo
		3	2,628	2,324	2,476	235,2408377	Positivo	Positivo
		4	0,092	0,093	0,0925	-3,109162304	Negativo	Negativo
		5	0,09	0,091	0,0905	-3,309162304	Negativo	Negativo
		6	0,222	0,172	0,197	7,340837696	Negativo	Negativo
		7	0,106	0,113	0,1095	-1,409162304	Negativo	Negativo
		8	0,122	0,137	0,1295	0,590837696	Negativo	Negativo
		9	2,271	2,209	2,24	211,6408377	Positivo	Negativo
		10	0,255	0,792	0,5235	39,9908377	Inconclusivo	Positivo
		11	0,12	0,117	0,1185	-0,509162304	Negativo	Negativo
		12	0,138	0,118	0,128	0,440837696	Negativo	Negativo
		13	1,825	1,719	1,772	164,8408377	Positivo	Negativo
		3	R-4	1	3,251	3,5	3,3755	325,1908377
2	1,786			2,093	1,9395	179,1	Positivo	Negativo
3	1,576			1,634	1,605	145,65	Positivo	Positivo
4	1,398			1,462	1,43	128,15	Positivo	Positivo
5	0,104			0,102	0,103	-4,55	Negativo	Negativo
6	0,909			0,906	0,9075	75,9	Positivo	Negativo
7	3,196			2,793	2,9945	284,6	Positivo	Positivo
8	0,094			0,068	0,081	-6,75	Negativo	Negativo
9	0,165			0,199	0,182	3,35	Negativo	Negativo
10	2,929			2,836	2,8825	273,4	Positivo	Inconclusivo

		11	2,992	2,04	2,516	236,75	Positivo	Negativo
		12	1,207	0,82	1,0135	86,5	Positivo	Positivo
		13	0,086	0,091	0,0885	-6	Negativo	Negativo
		14	0,093	0,085	0,089	-5,95	Negativo	Negativo
		15	2,966	2,875	2,9205	277,2	Negativo	Negativo
		16	2,099	2,209	2,154	200,55	Positivo	Negativo
		17	0,145	0,133	0,139	-0,95	Positivo	Negativo
		18	0,078	0,076	0,077	-7,15	Negativo	Negativo
		19	1,729	1,747	1,738	158,95	Positivo	Negativo
		20	0,076	0,07	0,073	-7,55	Negativo	Negativo
		21	0,681	0,593	0,637	48,85	Positivo	Negativo
		22	0,068	0,067	0,0675	-8,1	Negativo	Negativo
		23	0,096	0,087	0,0915	-5,7	Negativo	Negativo
		24	0,074	0,068	0,071	-7,75	Negativo	Negativo
		25	0,069	0,073	0,071	-7,75	Negativo	Negativo
		26	1,564	1,516	1,54	139,15	Positivo	Negativo
		27	2,98	3,076	3,028	287,95	Positivo	Positivo
		28	0,097	0,088	0,0925	-5,6	Negativo	Negativo
		29	0,061	0,06	0,0605	-8,8	Negativo	Negativo
		30	3,02	3,132	3,076	292,75	Positivo	Positivo
		31	3,241	3,096	3,1685	302	Positivo	Positivo
		32	3,099	3,066	3,0825	293,4	Positivo	Negativo

4		33	0,065	0,072	0,0685	-8	Negativo	Negativo
		34	0,073	0,075	0,074	-7,45	Negativo	Negativo
		35	0,081	0,077	0,079	-6,95	Negativo	Negativo
		36	0,114	0,104	0,109	-3,95	Negativo	Negativo
		37	0,076	0,067	0,0715	-7,7	Negativo	Negativo
		38	0,065	0,066	0,0655	-8,3	Negativo	Negativo
		39	0,072	0,071	0,0715	-7,7	Negativo	Negativo
		40	0,112	0,107	0,1095	-3,9	Negativo	Negativo
	R-5	1	0,074	0,071	0,0725	-7,6	Negativo	Negativo
		2	0,111	0,089	0,1	-4,85	Negativo	Negativo
		3	0,41	0,39	0,4	25,15	Negativo	Negativo
		4	2,066	1,967	2,0165	186,8	Positivo	Negativo
		5	2,159	2,202	2,1805	203,2	Positivo	Positivo
		6	1,657	1,351	1,504	135,55	Positivo	Inconclusivo
7		0,078	0,071	0,0745	-7,4	Negativo	Negativo	
8		2,47	2,448	2,459	234,9380952	Positivo	Positivo	
9		1,33	1,352	1,341	123,1380952	Positivo	Negativo	
10		1,886	2,166	2,026	191,6380952	Positivo	Positivo	
11		1,98	2,064	2,022	191,2380952	Positivo	Positivo	
12		2,504	2,229	2,3665	225,6880952	Positivo	Positivo	
13		2,27	2,436	2,353	224,3380952	Positivo	Positivo	
14		1,474	1,526	1,5	139,0380952	Positivo	Negativo	

R-6	15	2,573	2,588	2,5805	247,0880952	Positivo	Positivo
	16	2,349	2,455	2,402	229,2380952	Positivo	Negativo
	17	1,891	1,75	1,8205	171,0880952	Positivo	Negativo
	18	0,086	0,085	0,0855	-2,411904762	Negativo	Negativo
	19	0,114	0,115	0,1145	0,488095238	Negativo	Negativo
	20	0,427	0,445	0,436	32,63809524	Inconclusivo	Negativo
	21	2,1	2,178	2,139	202,9380952	Positivo	Negativo
	22	1,983	2,14	2,0615	195,1880952	Positivo	Negativo
	23	1,634	1,704	1,669	155,9380952	Positivo	Positivo
	24	1,707	1,9	1,8035	169,3880952	Positivo	Negativo
	25	1,977	1,831	1,904	179,4380952	Positivo	Positivo
	26	0,108	0,098	0,103	-0,661904762	Negativo	Negativo
	27	2,793	2,748	2,7705	266,0880952	Positivo	Positivo
	28	0,089	0,09	0,0895	-2,011904762	Positivo	Negativo
	29	0,555	0,658	0,6065	49,68809524	Positivo	Negativo
	30	0,084	0,091	0,0875	-2,211904762	Negativo	Negativo
	31	0,081	0,067	0,074	-3,561904762	Negativo	Negativo
	32	0,077	0,078	0,0775	-3,211904762	Negativo	Negativo
	33	0,088	0,086	0,087	-2,261904762	Negativo	Negativo
	34	1,359	1,291	1,325	121,5380952	Positivo	Positivo
35	0,1	0,109	0,1045	-0,511904762	Negativo	Negativo	
36	1,275	1,299	1,287	117,7380952	Positivo	Negativo	

		37	0,139	0,139	0,139	2,938095238	Negativo	Negativo
		38	2,843	3,129	2,986	287,6380952	Positivo	Positivo
		39	0,089	0,23	0,1595	4,988095238	Negativo	Negativo
		40	1,594	1,626	1,61	150,0380952	Positivo	Negativo
	R-7	1	0,073	0,082	0,0775	-3,211904762	Negativo	Negativo
		2	1,416	1,198	1,307	119,7380952	Positivo	Negativo
		3	2,389	2,255	2,322	221,2380952	Positivo	Positivo
		4	0,27	0,247	0,2585	14,88809524	Negativo	Negativo
		5	3,067	3,691	3,379	326,9380952	Positivo	Positivo
		6	1,998	1,966	1,982	187,2380952	Positivo	Positivo
		7	0,243	0,214	0,2285	11,88809524	Negativo	Negativo
		8	0,102	0,156	0,129	1,938095238	Negativo	Negativo
		9	0,08	0,095	0,0875	-2,211904762	Negativo	Negativo
10		0,103	0,105	0,104	-0,561904762	Negativo	Negativo	
R-8	11	1,622	1,419	1,5205	141,0880952	Positivo	Inconclusivo	
	12	0,494	1,064	0,779	66,93809524	Positivo	Negativo	
	13	1,959	2,135	2,047	193,7380952	Positivo	Positivo	
	1	0,433	0,355	0,394	28,43809524	Negativo	Negativo	
	2	1,006	1,11	1,058	95,81128527	Positivo	Inconclusivo	
5	R-8	3	0,101	0,102	0,1015	0,161285266	Negativo	Negativo
		4	3,35	3,508	3,429	332,9112853	Positivo	Positivo
		5	1,981	1,985	1,983	188,3112853	Positivo	Negativo

		6	0,089	0,093	0,091	-0,888714734	Negativo	Negativo
		7	2,519	2,548	2,5335	243,3612853	Positivo	Positivo
		8	2,862	2,997	2,9295	282,9612853	Positivo	Positivo
		9	0,086	0,082	0,084	-1,588714734	Negativo	Negativo
		10	2,99	3,022	3,006	290,6112853	Positivo	Positivo
		11	0,094	0,099	0,0965	-0,338714734	Negativo	Negativo
		12	0,103	0,103	0,103	0,311285266	Negativo	Negativo
		13	0,13	0,161	0,1455	4,561285266	Negativo	Negativo
		14	0,087	0,093	0,09	-0,988714734	Negativo	Negativo
		15	0,166	0,165	0,1655	6,561285266	Negativo	Negativo
		16	2,724	2,799	2,7615	266,1612853	Positivo	Positivo
		17	0,098	0,103	0,1005	0,061285266	Negativo	Negativo
		18	0,138	0,131	0,1345	3,461285266	Negativo	Negativo
		19	0,124	0,119	0,1215	2,161285266	Negativo	Negativo
		20	0,095	0,088	0,0915	-0,838714734	Negativo	Negativo
	R-9	21	0,468	0,45	0,459	35,91128527	Inconclusivo	Negativo
		22	0,107	0,106	0,1065	0,661285266	Negativo	Negativo
		23	0,149	0,129	0,139	3,911285266	Negativo	Negativo
		24	0,191	0,163	0,177	7,711285266	Negativo	Negativo
		25	0,085	0,082	0,0835	-1,638714734	Negativo	Negativo
		26	0,27	0,297	0,2835	18,36128527	Negativo	Negativo
		27	0,306	0,322	0,314	21,41128527	Negativo	Negativo

		28	0,113	0,107	0,11	1,011285266	Negativo	Negativo
		29	0,095	0,094	0,0945	-0,538714734	Negativo	Negativo
		30	0,102	0,091	0,0965	-0,338714734	Negativo	Negativo
		31	0,094	0,084	0,089	-1,088714734	Negativo	Negativo
		32	0,088	0,082	0,085	-1,488714734	Negativo	Negativo
		33	0,075	0,082	0,0785	-2,138714734	Negativo	Negativo
		34	0,104	0,088	0,096	-0,388714734	Negativo	Negativo
		35	0,085	0,089	0,087	-1,288714734	Negativo	Negativo
		36	0,086	0,099	0,0925	-0,738714734	Negativo	Negativo
		37	0,091	0,083	0,087	-1,288714734	Negativo	Negativo
		38	0,142	0,124	0,133	3,311285266	Negativo	Negativo
		39	0,106	0,103	0,1045	0,461285266	Negativo	Negativo
		40	0,155	0,122	0,1385	3,861285266	Negativo	Negativo
	R-10	1	0,093	0,082	0,0875	-1,238714734	Negativo	Negativo
		2	3,222	3,128	3,175	307,5112853	Positivo	Positivo
		3	0,123	0,122	0,1225	2,261285266	Negativo	Negativo
		4	0,823	0,782	0,8025	70,26128527	Positivo	Negativo
		5	0,107	0,097	0,102	0,211285266	Negativo	Negativo
		6	0,102	0,101	0,1015	0,161285266	Negativo	Negativo
		7	0,093	0,095	0,094	-0,588714734	Negativo	Negativo
6	8	0,074	0,076	0,075	-2,488714734	Negativo	Negativo	
	9	0,146	0,151	0,1485	4,467868676	Negativo	Negativo	

		10	1,408	1,376	1,392	128,8178687	Positivo	Negativo
		11	2,016	2,04	2,028	192,4178687	Positivo	Positivo
		12	0,159	0,165	0,162	5,817868676	Negativo	Negativo
	R-11	1	2,57	2,267	2,4185	231,4678687	Positivo	Negativo
		2	0,08	0,082	0,081	-2,282131324	Negativo	Negativo
		3	0,122	0,148	0,135	3,117868676	Negativo	Negativo
		4	2,96	2,865	2,9125	280,8678687	Positivo	Negativo
		5	0,081	0,096	0,0885	-1,532131324	Negativo	Positivo
		6	0,076	0,071	0,0735	-3,032131324	Negativo	Negativo
		7	0,073	0,088	0,0805	-2,332131324	Negativo	Negativo
		8	1,822	1,633	1,7275	162,3678687	Negativo	Negativo
		9	0,123	0,119	0,121	1,717868676	Negativo	Negativo
		10	0,075	0,08	0,0775	-2,632131324	Negativo	Negativo
		11	0,067	0,073	0,07	-3,382131324	Negativo	Negativo
		12	0,484	0,485	0,4845	38,06786868	Inconclusivo	Negativo
		13	1,513	1,385	1,449	134,5178687	Positivo	Negativo
		14	2,682	2,774	2,728	262,4178687	Positivo	Negativo
		15	3,222	3,4	3,311	320,7178687	Positivo	Negativo
		16	0,795	0,898	0,8465	74,26786868	Positivo	Negativo
		17	0,862	0,907	0,8845	78,06786868	Positivo	Negativo
		18	0,069	0,073	0,071	-3,282131324	Negativo	Negativo
		19	0,52	0,513	0,5165	41,26786868	Positivo	Negativo

		20	0,604	0,617	0,6105	50,66786868	Positivo	Negativo
		21	2,848	3,115	2,9815	287,7678687	Positivo	Negativo
		22	2,178	2,325	2,2515	214,7678687	Positivo	Negativo
		23	2,508	2,574	2,541	243,7178687	Positivo	Negativo
		24	0,097	0,092	0,0945	-0,932131324	Negativo	Negativo
		25	0,083	0,084	0,0835	-2,032131324	Negativo	Negativo
	R-12	1	0,068	0,071	0,0695	-3,432131324	Negativo	Negativo
		2	0,097	0,093	0,095	-0,882131324	Negativo	Negativo
		3	0,086	0,083	0,0845	-1,932131324	Negativo	Negativo
		4	0,066	0,085	0,0755	-2,832131324	Negativo	Negativo
		5	0,064	0,063	0,0635	-4,032131324	Negativo	Negativo
		6	0,086	0,076	0,081	-2,282131324	Negativo	Negativo
		7	0,084	0,083	0,0835	-2,032131324	Negativo	Negativo
		8	0,071	0,068	0,0695	-3,432131324	Negativo	Negativo
		9	0,082	0,093	0,0875	-1,632131324	Negativo	Negativo
		10	0,074	0,078	0,076	-2,782131324	Negativo	Negativo
		11	0,1	0,099	0,0995	-0,432131324	Negativo	Negativo
		12	0,062	0,082	0,072	-3,182131324	Negativo	Negativo
		13	0,07	0,071	0,0705	-3,332131324	Negativo	Negativo
		14	0,072	0,078	0,075	-2,882131324	Negativo	Negativo
		15	0,065	0,075	0,07	-3,382131324	Negativo	Negativo
		16	0,095	0,095	0,095	-0,882131324	Negativo	Negativo
		17	0,071	0,078	0,0745	-2,932131324	Negativo	Negativo
		18	0,072	0,072	0,072	-3,182131324	Negativo	Negativo

7	19	0,067	0,078	0,0725	-2,515408253	Negativo	Negativo
	20	0,081	0,099	0,09	-0,765408253	Negativo	Negativo
	21	0,064	0,088	0,076	-2,165408253	Negativo	Negativo
	22	1,399	1,266	1,3325	123,4845917	Positivo	Negativo
	23	0,151	0,148	0,1495	5,184591747	Negativo	Negativo
	24	0,104	0,109	0,1065	0,884591747	Negativo	Negativo
	25	0,075	0,072	0,0735	-2,415408253	Negativo	Negativo
	26	0,074	0,064	0,069	-2,865408253	Negativo	Negativo
	27	0,085	0,082	0,0835	-1,415408253	Negativo	Negativo
	28	0,077	0,085	0,081	-1,665408253	Negativo	Negativo
	29	0,069	0,062	0,0655	-3,215408253	Negativo	Negativo
	30	0,06	0,058	0,059	-3,865408253	Negativo	Negativo
	31	0,077	0,077	0,077	-2,065408253	Negativo	Negativo
	32	0,074	0,078	0,076	-2,165408253	Negativo	Negativo
	33	0,077	0,072	0,0745	-2,315408253	Negativo	Negativo
	34	0,072	0,067	0,0695	-2,815408253	Negativo	Negativo
	35	0,844	0,813	0,8285	73,08459175	Positivo	Negativo
	36	0,091	0,098	0,0945	-0,315408253	Negativo	Negativo
	37	0,125	0,137	0,131	3,334591747	Negativo	Negativo
	38	0,083	0,084	0,0835	-1,415408253	Negativo	Negativo
	39	0,072	0,073	0,0725	-2,515408253	Negativo	Negativo
	40	0,171	0,222	0,1965	9,884591747	Negativo	Negativo
	41	0,147	0,269	0,208	11,03459175	Negativo	Negativo
	42	0,104	0,083	0,0935	-0,415408253	Negativo	Negativo
	43	0,077	0,086	0,0815	-1,615408253	Negativo	Negativo

		44	0,116	0,098	0,107	0,934591747	Negativo	Negativo
		45	0,093	0,101	0,097	-0,065408253	Negativo	Negativo
		46	0,07	0,064	0,067	-3,065408253	Negativo	Negativo
		47	0,218	0,249	0,2335	13,58459175	Negativo	Negativo
		48	0,287	0,239	0,263	16,53459175	Negativo	Negativo
		49	0,082	0,083	0,0825	-1,515408253	Negativo	Negativo
		50	0,102	0,092	0,097	-0,065408253	Negativo	Negativo
		51	0,619	0,646	0,6325	53,48459175	Positivo	Negativo
		52	0,097	0,07	0,0835	-1,415408253	Negativo	Negativo
		53	1,219	1,138	1,1785	108,0845917	Positivo	Negativo
		54	0,101	0,105	0,103	0,534591747	Negativo	Negativo
		55	0,082	0,085	0,0835	-1,415408253	Negativo	Negativo
		56	0,106	0,113	0,1095	1,184591747	Negativo	Negativo
		57	0,098	0,085	0,0915	-0,615408253	Negativo	Negativo
		58	1,064	1,006	1,035	93,73459175	Positivo	Negativo
		59	0,098	0,109	0,1035	0,584591747	Negativo	Negativo
		60	0,093	0,099	0,096	-0,165408253	Negativo	Negativo
		61	0,083	0,081	0,082	-1,565408253	Negativo	Negativo
		62	0,082	0,089	0,0855	-1,215408253	Negativo	Negativo
		8	R-13	1	1,488	1,526	1,507	140,9345917
2	0,275			0,085	0,18	8,234591747	Negativo	Negativo
3	0,099			0,104	0,1015	0,384591747	Negativo	Negativo
4	2,416			2,125	2,2705	218,15652	Positivo	Positivo
5	2,83			3,047	2,9385	284,95652	Positivo	Positivo

		6	3,607	3,73	3,6685	357,95652	Positivo	Positivo
		7	0,936	0,994	0,965	87,60651997	Positivo	Positivo
		8	1,185	0,98	1,0825	99,35651997	Positivo	Negativo
		9	0,105	0,109	0,107	1,806519967	Negativo	Negativo
		10	1,157	1,213	1,185	109,60652	Positivo	Negativo
		11	0,091	0,088	0,0895	0,056519967	Negativo	Negativo
		12	0,088	0,091	0,0895	0,056519967	Negativo	Negativo
		13	2,905	2,898	2,9015	281,25652	Positivo	Negativo
		14	0,179	0,173	0,176	8,706519967	Negativo	Negativo
		15	3,214	2,96	3,087	299,80652	Positivo	Negativo
		16	0,126	0,107	0,1165	2,756519967	Negativo	Negativo
		17	3,067	3,544	3,3055	321,65652	Positivo	Negativo
		18	1,808	2,592	2,2	211,10652	Positivo	Negativo
		19	1,152	0,932	1,042	95,30651997	Positivo	Negativo
		20	1,013	0,92	0,9665	87,75651997	Positivo	Positivo
		21	0,072	0,073	0,0725	-1,643480033	Negativo	Negativo
		22	0,754	0,795	0,7745	68,55651997	Positivo	Negativo
		23	1,509	1,397	1,453	136,40652	Positivo	Inconclusivo
		24	0,613	0,586	0,5995	51,05651997	Positivo	Positivo
		25	0,402	0,383	0,3925	30,35651997	Inconclusivo	Negativo
		26	0,083	0,091	0,087	-0,193480033	Negativo	Negativo
		27	1,525	1,453	1,489	140,00652	Positivo	Inconclusivo

		28	2,037	2,21	2,1235	203,45652	Positivo	Positivo
		29	0,134	0,112	0,123	3,406519967	Negativo	Negativo
		30	2,867	3,102	2,9845	289,55652	Positivo	Positivo
		31	1,186	1,055	1,1205	103,15652	Positivo	Inconclusivo
		32	0,791	0,75	0,7705	68,15651997	Positivo	Negativo
		33	2,115	2,256	2,1855	209,65652	Positivo	Positivo
		34	1,163	1,162	1,1625	107,35652	Positivo	Negativo
		35	0,126	0,107	0,1165	2,756519967	Negativo	Negativo
		36	1,036	0,999	1,0175	92,85651997	Positivo	Negativo
		37	1,074	0,992	1,033	94,40651997	Positivo	Negativo
		38	0,088	0,086	0,087	-0,193480033	Negativo	Negativo
		39	0,085	0,086	0,0855	-0,343480033	Negativo	Negativo
		40	1,843	1,715	1,779	169,00652	Positivo	Positivo
		41	2,738	2,871	2,8045	271,55652	Positivo	Positivo
		42	2,456	2,814	2,635	254,60652	Positivo	Positivo
		43	1,769	1,787	1,778	168,90652	Positivo	Positivo
		44	0,109	0,114	0,1115	2,256519967	Negativo	Negativo
		45	0,089	0,087	0,088	-0,093480033	Negativo	Negativo
		46	0,115	0,108	0,1115	2,256519967	Negativo	Negativo
		47	0,096	0,084	0,09	0,106519967	Negativo	Negativo
		48	0,091	0,085	0,088	-0,093480033	Negativo	Negativo
		49	0,316	0,288	0,302	21,30651997	Negativo	Negativo

		50	0,074	0,074	0,074	-1,493480033	Negativo	Negativo
9		51	3,01	3,009	3,0095	286,5566176	Positivo	Positivo
		52	0,09	0,1	0,095	-4,893382353	Negativo	Negativo
		53	2,505	1,507	2,006	186,2066176	Positivo	Positivo
		54	1,626	1,618	1,622	147,8066176	Positivo	Positivo
		55	0,126	0,118	0,122	-2,193382353	Negativo	Negativo
		56	0,131	0,108	0,1195	-2,443382353	Negativo	Negativo
		57	0,172	0,199	0,1855	4,156617647	Negativo	Negativo
		58	2,703	2,696	2,6995	255,5566176	Positivo	Positivo
		59	0,219	0,204	0,2115	6,756617647	Negativo	Negativo
		60	1,498	1,508	1,503	135,9066176	Positivo	Positivo
		61	0,083	0,088	0,0855	-5,843382353	Negativo	Negativo
		62	0,412	0,405	0,4085	26,45661765	Negativo	Negativo
		63	0,101	0,101	0,101	-4,293382353	Negativo	Negativo
		64	2,03	1,936	1,983	183,9066176	Positivo	Negativo

APÊNDICE B - Resultados de ELISA Idexx® anti-*Mycobacterium bovis* X TCC



Resultados de ELISA Idexx® anti-*Mycobacterium bovis* X TCC
 Responsável: Luiz Carlos Fontes Baptista Filho – CRMV-PE: 3745



Placa 1

Rebanho	Amostra	Absorbância				S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
		1	Absorbância 2	Absorbância Média				
	Controle +	0,582	0,699	0,6405				
	Controle -	0,13	0,104	0,117				
1	1	0,093	0,078	0,0855	-0,06017	Negativo	Negativo	
	2	0,115	0,107	0,111	-0,01146	Negativo	Inconclusivo	
	3	0,071	0,078	0,0745	-0,08118	Negativo	Negativo	
	4	0,105	0,088	0,0965	-0,03916	Negativo	Negativo	
	5	0,08	0,078	0,079	-0,07259	Negativo	Negativo	
	6	0,17	0,092	0,131	0,026743	Negativo	Negativo	
	7	0,124	0,089	0,1065	-0,02006	Negativo	Negativo	
	8	0,095	0,103	0,099	-0,03438	Negativo	Negativo	
	9	0,094	0,095	0,0945	-0,04298	Negativo	Negativo	
	10	0,124	0,102	0,113	-0,00764	Negativo	Negativo	
	11	0,121	0,116	0,1185	0,002865	Negativo	Negativo	
2	1	0,118	0,089	0,1035	-0,02579	Negativo	POSITIVO	
	2	0,083	0,086	0,0845	-0,06208	Negativo	Negativo	
	3	0,14	0,102	0,121	0,007641	Negativo	Negativo	
	4	0,1	0,096	0,098	-0,03629	Negativo	Negativo	
	5	0,135	0,112	0,1235	0,012416	Negativo	Negativo	
	6	0,098	0,109	0,1035	-0,02579	Negativo	Negativo	
	7	0,099	0,107	0,103	-0,02674	Negativo	Negativo	
	8	0,08	0,089	0,0845	-0,06208	Negativo	Inconclusivo	
	9	0,108	0,106	0,107	-0,0191	Negativo	Inconclusivo	
	10	0,091	0,113	0,102	-0,02865	Negativo	Negativo	
	11	0,11	0,088	0,099	-0,03438	Negativo	Negativo	

12	0,084	0,067	0,0755	-0,07927	Negativo	Negativo
13	0,065	0,112	0,0885	-0,05444	Negativo	Negativo
14	0,096	0,201	0,1485	0,060172	Negativo	Negativo
15	0,082	0,062	0,072	-0,08596	Negativo	Negativo
16	0,154	0,119	0,1365	0,037249	Negativo	Negativo
17	0,127	0,116	0,1215	0,008596	Negativo	Negativo
18	0,144	0,094	0,119	0,00382	Negativo	Negativo
19	0,105	0,078	0,0915	-0,04871	Negativo	Negativo
20	0,156	0,091	0,1235	0,012416	Negativo	Negativo
21	0,058	0,07	0,064	-0,10124	Negativo	Negativo
22	0,117	0,112	0,1145	-0,00478	Negativo	POSITIVO
23	0,095	0,11	0,1025	-0,0277	Negativo	Negativo
24	0,106	0,121	0,1135	-0,00669	Negativo	Negativo
25	0,12	0,112	0,116	-0,00191	Negativo	Negativo
26	0,096	0,097	0,0965	-0,03916	Negativo	Inconclusivo
27	0,079	0,101	0,09	-0,05158	Negativo	Negativo
28	0,087	0,083	0,085	-0,06113	Negativo	Negativo
29	0,098	0,125	0,1115	-0,01051	Negativo	Negativo
30	0,12	0,073	0,0965	-0,03916	Negativo	Negativo
31	0,085	0,111	0,098	-0,03629	Negativo	Negativo
32	0,103	0,087	0,095	-0,04202	Negativo	Negativo
33	0,12	0,122	0,121	0,007641	Negativo	Negativo
34	0,108	0,115	0,1115	-0,01051	Negativo	Inconclusivo
35	0,131	0,088	0,1095	-0,01433	Negativo	Negativo

Placa 2

Rebanho	Amostra	Absorbância		Absorbância	S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
		1	Absorbância 2	Média			
	Controle +	0,816	0,922	0,869			
	Controle -	0,086	0,074	0,08			
2	36	0,06	0,078	0,069	-0,01394	Negativo	Negativo
	37	0,136	0,118	0,127	0,059569	Negativo	Negativo
	38	0,113	0,109	0,111	0,03929	Negativo	Negativo
	39	0,109	0,139	0,124	0,055767	Negativo	Negativo
	40	0,085	0,087	0,086	0,007605	Negativo	Negativo
	41	0,11	0,121	0,1155	0,044994	Negativo	Negativo
	42	0,136	0,106	0,121	0,051965	Negativo	Negativo
	43	0,101	0,089	0,095	0,019011	Negativo	Negativo
	44	0,367	0,422	0,3945	0,398606	POSITIVO	Negativo
	45	0,094	0,12	0,107	0,034221	Negativo	Negativo
	46	0,105	0,077	0,091	0,013942	Negativo	Negativo
	47	0,091	0,089	0,09	0,012674	Negativo	Negativo
	48	0,127	0,096	0,1115	0,039924	Negativo	Negativo
	49	0,072	0,093	0,0825	0,003169	Negativo	Negativo
	50	0,103	0,085	0,094	0,017744	Negativo	Negativo
	51	0,074	0,071	0,0725	-0,00951	Negativo	Negativo
	52	0,097	0,111	0,104	0,030418	Negativo	Negativo
	53	0,121	0,417	0,269	0,239544	Negativo	Negativo
	54	0,073	0,069	0,071	-0,01141	Negativo	Negativo
	55	0,056	0,072	0,064	-0,02028	Negativo	Negativo
56	0,058	0,064	0,061	-0,02408	Negativo	Negativo	
57	0,084	0,091	0,0875	0,009506	Negativo	Negativo	
58	0,074	0,082	0,078	-0,00253	Negativo	Negativo	
59	0,072	0,087	0,0795	-0,00063	Negativo	Negativo	
60	0,114	0,136	0,125	0,057034	Negativo	Negativo	

	61	0,074	0,064	0,069	-0,01394	Negativo	Negativo	
	62	0,074	0,072	0,073	-0,00887	Negativo	Inconclusivo	
	63	0,056	0,058	0,057	-0,02915	Negativo	Negativo	
	64	0,088	0,105	0,0965	0,020913	Negativo	Negativo	
	65	0,16	0,201	0,1805	0,127376	Negativo	Negativo	
	66	0,085	0,076	0,0805	0,000634	Negativo	Negativo	
	67	0,095	0,1	0,0975	0,02218	Negativo	Negativo	
	68	0,085	0,12	0,1025	0,028517	Negativo	Negativo	
	69	0,068	0,074	0,071	-0,01141	Negativo	Negativo	
	3	1	0,113	0,079	0,096	0,020279	Negativo	Negativo
		2	0,172	0,087	0,1295	0,062738	Negativo	Negativo
		3	0,16	0,094	0,127	0,059569	Negativo	Negativo
4		0,083	0,076	0,0795	-0,00063	Negativo	Negativo	
5		0,145	0,158	0,1515	0,090621	Negativo	Negativo	
6		0,1	0,08	0,09	0,012674	Negativo	Negativo	
7		0,074	0,064	0,069	-0,01394	Negativo	Negativo	
8		0,086	0,109	0,0975	0,02218	Negativo	Negativo	
9		0,174	0,155	0,1645	0,107098	Negativo	Negativo	
10		0,142	0,138	0,14	0,076046	Negativo	Negativo	
11		0,11	0,097	0,1035	0,029785	Negativo	Negativo	
12		0,091	0,122	0,1065	0,033587	Negativo	Negativo	

Placa 3

Rebanho	Amostra	Absorbância			S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
		1	Absorbância 2	Absorbância Média			
	Controle +	0,643	0,528	0,5855			
	Controle -	0,102	0,063	0,0825			
3	13	0,057	0,068	0,0625	-0,039761	Negativo	Negativo
	1	0,065	0,078	0,0715	-0,021869	Negativo	Negativo
4	2	0,119	0,1	0,1095	0,0536779	Negativo	Negativo
	3	0,1	0,097	0,0985	0,0318091	Negativo	Negativo
	4	0,078	0,082	0,08	-0,00497	Negativo	Negativo
	5	0,111	0,137	0,124	0,082505	Negativo	Negativo
	6	0,268	0,209	0,2385	0,3101392	POSITIVO	Negativo
	7	0,087	0,076	0,0815	-0,001988	Negativo	Negativo
	8	0,142	0,132	0,137	0,1083499	Negativo	Negativo
	9	0,075	0,066	0,0705	-0,023857	Negativo	Negativo
	10	0,119	0,125	0,122	0,0785288	Negativo	Negativo
	11	0,954	0,958	0,956	1,7365805	POSITIVO	Negativo
	12	0,1	0,084	0,092	0,0188867	Negativo	Negativo
	13	0,083	0,121	0,102	0,0387674	Negativo	Negativo
	14	0,113	0,086	0,0995	0,0337972	Negativo	Negativo
	15	0,057	0,069	0,063	-0,038767	Negativo	Negativo
	16	0,085	0,078	0,0815	-0,001988	Negativo	Negativo
	17	0,072	0,1	0,086	0,0069583	Negativo	Negativo
	18	0,085	0,081	0,083	0,000994	Negativo	Negativo
	19	0,066	0,096	0,081	-0,002982	Negativo	Negativo
	20	0,083	0,088	0,0855	0,0059642	Negativo	Negativo
	21	0,083	0,078	0,0805	-0,003976	Negativo	Negativo
	22	0,108	0,072	0,09	0,0149105	Negativo	Negativo
	23	0,096	0,112	0,104	0,0427435	Negativo	Negativo
	24	0,092	0,08	0,086	0,0069583	Negativo	Negativo

	25	0,088	0,073	0,0805	-0,003976	Negativo	Negativo
	26	0,176	0,094	0,135	0,1043738	Negativo	Negativo
	27	0,107	0,107	0,107	0,0487078	Negativo	Negativo
	28	0,145	0,132	0,1385	0,111332	Negativo	Negativo
	29	0,065	0,088	0,0765	-0,011928	Negativo	Negativo
	30	0,132	0,081	0,1065	0,0477137	Negativo	Negativo
	31	0,088	0,084	0,086	0,0069583	Negativo	Negativo
	32	0,081	0,084	0,0825	0	Negativo	Negativo
	33	0,102	0,083	0,0925	0,0198807	Negativo	Negativo
	34	0,115	0,114	0,1145	0,0636183	Negativo	Negativo
	35	0,075	0,082	0,0785	-0,007952	Negativo	Negativo
	36	0,078	0,077	0,0775	-0,00994	Negativo	Negativo
	37	0,076	0,081	0,0785	-0,007952	Negativo	Negativo
	38	0,076	0,094	0,085	0,0049702	Negativo	Negativo
	39	0,077	0,064	0,0705	-0,023857	Negativo	Negativo
	40	0,088	0,063	0,0755	-0,013917	Negativo	Negativo
5	1	0,089	0,082	0,0855	0,0059642	Negativo	Negativo
	2	0,065	0,085	0,075	-0,014911	Negativo	Negativo
	3	0,086	0,083	0,0845	0,0039761	Negativo	Inconclusivo
	4	0,098	0,11	0,104	0,0427435	Negativo	Negativo
	5	0,075	0,087	0,081	-0,002982	Negativo	Negativo

Placa 4

Rebanho	Amostra	Absorbância				S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
		1	Absorbância 2	Absorbância Média				
	Controle +	0,435	0,481	0,458				
	Controle -	0,1	0,092	0,096				
5	6	0,118	0,103	0,1105	0,040055	Negativo	Negativo	
	7	0,112	0,118	0,115	0,052486	Negativo	Negativo	
	8	0,075	0,081	0,078	-0,04972	Negativo	Negativo	
	9	0,074	0,072	0,073	-0,06354	Negativo	Negativo	
	10	0,123	0,102	0,1125	0,04558	Negativo	Negativo	
	11	0,078	0,137	0,1075	0,031768	Negativo	Negativo	
	12	0,075	0,059	0,067	-0,08011	Negativo	Negativo	
	13	0,075	0,093	0,084	-0,03315	Negativo	Negativo	
	14	0,563	0,505	0,534	1,209945	POSITIVO	Negativo	
	15	0,1	0,117	0,1085	0,03453	Negativo	Negativo	
	16	0,164	0,157	0,1605	0,178177	Negativo	Negativo	
	17	0,076	0,071	0,0735	-0,06215	Negativo	Negativo	
	18	0,062	0,063	0,0625	-0,09254	Negativo	Negativo	
	6	19	0,108	0,116	0,112	0,044199	Negativo	Negativo
20		0,065	0,076	0,0705	-0,07044	Negativo	Negativo	
21		0,06	0,057	0,0585	-0,10359	Negativo	Negativo	
22		0,059	0,081	0,07	-0,07182	Negativo	Negativo	
23		0,078	0,111	0,0945	-0,00414	Negativo	Negativo	
24		0,082	0,084	0,083	-0,03591	Negativo	Negativo	
25		0,075	0,053	0,064	-0,0884	Negativo	Negativo	
26		0,183	0,074	0,1285	0,089779	Negativo	Negativo	
27		0,071	0,075	0,073	-0,06354	Negativo	Negativo	
28		0,113	0,073	0,093	-0,00829	Negativo	Negativo	
29		0,09	0,084	0,087	-0,02486	Negativo	Negativo	
30		0,06	0,077	0,0685	-0,07597	Negativo	Negativo	

	31	0,075	0,084	0,0795	-0,04558	Negativo	Negativo
	32	0,118	0,06	0,089	-0,01934	Negativo	Negativo
	33	0,07	0,075	0,0725	-0,06492	Negativo	Negativo
	34	0,072	0,053	0,0625	-0,09254	Negativo	Negativo
	35	0,103	0,098	0,1005	0,012431	Negativo	Negativo
	36	0,08	0,075	0,0775	-0,0511	Negativo	Negativo
	37	0,083	0,081	0,082	-0,03867	Negativo	Negativo
	38	0,074	0,089	0,0815	-0,04006	Negativo	Negativo
	39	0,073	0,112	0,0925	-0,00967	Negativo	Negativo
	40	0,07	0,087	0,0785	-0,04834	Negativo	Negativo
7	1	0,075	0,061	0,068	-0,07735	Negativo	Negativo
	2	0,062	0,078	0,07	-0,07182	Negativo	Negativo
	3	0,093	0,069	0,081	-0,04144	Negativo	Negativo
	4	0,08	0,08	0,08	-0,0442	Negativo	Negativo
	5	0,532	0,492	0,512	1,149171	POSITIVO	Negativo
	6	0,129	0,078	0,1035	0,020718	Negativo	Negativo
	7	0,081	0,087	0,084	-0,03315	Negativo	Negativo
	8	0,082	0,085	0,0835	-0,03453	Negativo	Negativo
	9	0,115	0,101	0,108	0,033149	Negativo	Negativo
	10	0,109	0,116	0,1125	0,04558	Negativo	POSITIVO
	11	0,147	0,13	0,1385	0,117403	Negativo	Negativo

Placa 5

Rebanho	Amostra	Absorbância		Absorbância	S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
		1	Absorbância 2	Média			
	Controle +	0,629	0,603	0,616			
	Controle -	0,083	0,088	0,0855			
7	12	0,068	0,087	0,0775	-0,01508	Negativo	Negativo
	13	0,084	0,073	0,0785	-0,0132	Negativo	POSITIVO
8	1	0,104	0,093	0,0985	0,024505	Negativo	Negativo
	2	0,075	0,063	0,069	-0,0311	Negativo	Negativo
	3	0,093	0,088	0,0905	0,009425	Negativo	Negativo
	4	0,119	0,081	0,1	0,027333	Negativo	Negativo
	5	0,076	0,071	0,0735	-0,02262	Negativo	Negativo
	6	0,065	0,071	0,068	-0,03299	Negativo	Negativo
	7	0,08	0,057	0,0685	-0,03205	Negativo	Negativo
	8	0,055	0,061	0,058	-0,05184	Negativo	Negativo
	9	0,138	0,117	0,1275	0,079171	Negativo	Negativo
	10	0,067	0,091	0,079	-0,01225	Negativo	Negativo
	11	0,11	0,077	0,0935	0,01508	Negativo	Negativo
	12	0,072	0,056	0,064	-0,04053	Negativo	Negativo
	13	0,053	0,059	0,056	-0,05561	Negativo	Negativo
	14	0,08	0,068	0,074	-0,02168	Negativo	Negativo
	15	0,081	0,089	0,085	-0,00094	Negativo	Negativo
	16	0,112	0,084	0,098	0,023563	Negativo	Negativo
	17	0,074	0,066	0,07	-0,02922	Negativo	Negativo
	18	0,059	0,058	0,0585	-0,0509	Negativo	Negativo
19	0,072	0,11	0,091	0,010368	Negativo	Negativo	
20	0,084	0,093	0,0885	0,005655	Negativo	Negativo	
9	21	0,06	0,093	0,0765	-0,01697	Negativo	Inconclusivo
	22	0,066	0,061	0,0635	-0,04147	Negativo	Negativo
	23	0,054	0,095	0,0745	-0,02074	Negativo	POSITIVO

	24	0,066	0,062	0,064	-0,04053	Negativo	Negativo
	25	0,058	0,064	0,061	-0,04618	Negativo	Negativo
	26	0,06	0,074	0,067	-0,03487	Negativo	Inconclusivo
	27	0,06	0,068	0,064	-0,04053	Negativo	Negativo
	28	0,063	0,073	0,068	-0,03299	Negativo	POSITIVO
	29	0,067	0,065	0,066	-0,03676	Negativo	Negativo
	30	0,07	0,064	0,067	-0,03487	Negativo	Negativo
	31	0,075	0,058	0,0665	-0,03582	Negativo	Negativo
	32	0,069	0,08	0,0745	-0,02074	Negativo	Negativo
	33	0,108	0,079	0,0935	0,01508	Negativo	POSITIVO
	34	0,067	0,067	0,067	-0,03487	Negativo	Inconclusivo
	35	0,07	0,066	0,068	-0,03299	Negativo	Negativo
	36	0,06	0,062	0,061	-0,04618	Negativo	Negativo
	37	0,057	0,062	0,0595	-0,04901	Negativo	Negativo
	38	2,93	3,008	2,969	5,435438	POSITIVO	Negativo
	39	0,069	0,063	0,066	-0,03676	Negativo	Negativo
	40	0,066	0,065	0,0655	-0,0377	Negativo	Negativo
11	1	0,078	0,073	0,0755	-0,01885	Negativo	Negativo
	2	0,069	0,082	0,0755	-0,01885	Negativo	Negativo
	3	0,086	0,098	0,092	0,012253	Negativo	Negativo
	4	0,088	0,082	0,085	-0,00094	Negativo	Negativo

Placa 6

Rebanho	Amostra	Absorbância		Absorbância	S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
		1	Absorbância 2	Média			
	Controle +	0,857	0,585	0,721			
	Controle -	0,091	0,08	0,0855			
11	5	0,068	0,094	0,081	-0,00708	Negativo	Negativo
	6	0,082	0,083	0,0825	-0,00472	Negativo	Negativo
	7	0,126	0,085	0,1055	0,031471	Negativo	Negativo
	8	0,068	0,088	0,078	-0,0118	Negativo	Negativo
	9	0,099	0,066	0,0825	-0,00472	Negativo	Negativo
	10	0,086	0,075	0,0805	-0,00787	Negativo	Negativo
	11	0,088	0,075	0,0815	-0,00629	Negativo	Negativo
	12	0,088	0,09	0,089	0,005507	Negativo	Negativo
	13	0,09	0,086	0,088	0,003934	Negativo	Negativo
	14	0,078	0,091	0,0845	-0,00157	Negativo	Negativo
	15	0,092	0,097	0,0945	0,014162	Negativo	Negativo
	16	0,086	0,089	0,0875	0,003147	Negativo	Negativo
	17	0,09	0,08	0,085	-0,00079	Negativo	Negativo
	18	0,084	0,099	0,0915	0,009441	Negativo	Negativo
	19	0,139	0,093	0,116	0,047994	Negativo	Negativo
	20	0,095	0,082	0,0885	0,004721	Negativo	Negativo
	21	0,087	0,086	0,0865	0,001574	Negativo	Negativo
	22	0,093	0,105	0,099	0,021243	Negativo	Negativo
	23	0,098	0,101	0,0995	0,02203	Negativo	Negativo
	24	0,235	0,089	0,162	0,120378	Negativo	Negativo
25	0,08	0,078	0,079	-0,01023	Negativo	Negativo	
26	0,081	0,095	0,088	0,003934	Negativo	Negativo	
27	0,096	0,09	0,093	0,011802	Negativo	Negativo	
12	1	0,099	0,082	0,0905	0,007868	Negativo	Negativo
	2	0,074	0,092	0,083	-0,00393	Negativo	Negativo

	3	0,105	0,143	0,124	0,060582	Negativo	Negativo
	4	0,085	0,111	0,098	0,01967	Negativo	Negativo
	5	0,1	0,094	0,097	0,018096	Negativo	Negativo
	6	0,103	0,104	0,1035	0,028324	Negativo	Negativo
	7	0,165	0,175	0,17	0,132966	Negativo	Negativo
	8	0,099	0,087	0,093	0,011802	Negativo	Negativo
	9	0,09	0,104	0,097	0,018096	Negativo	Negativo
	10	0,121	0,085	0,103	0,027537	Negativo	Negativo
	11	0,185	0,213	0,199	0,1786	Negativo	Negativo
	12	0,107	0,118	0,1125	0,042486	Negativo	Negativo
	13	0,089	0,087	0,088	0,003934	Negativo	Negativo
	14	0,116	0,096	0,106	0,032258	Negativo	Negativo
	15	0,101	0,108	0,1045	0,029898	Negativo	Negativo
	16	0,15	0,176	0,163	0,121951	Negativo	Negativo
	17	0,099	0,105	0,102	0,025964	Negativo	Negativo
	18	0,121	0,084	0,1025	0,026751	Negativo	Negativo
	19	0,268	0,108	0,188	0,16129	Negativo	Negativo
	20	0,115	0,104	0,1095	0,037766	Negativo	Negativo
	21	0,094	0,096	0,095	0,014949	Negativo	Negativo
	22	0,089	0,089	0,089	0,005507	Negativo	Negativo
	23	0,189	0,163	0,176	0,142408	Negativo	Negativo

Placa 7

Rebanho	Amostra	Absorbância			S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
		1	Absorbância 2	Absorbância Média			
	Controle +	0,489	0,532	0,5105			
	Controle -	0,067	0,067	0,067			
12	24	0,072	0,112	0,092	0,05637	Negativo	Negativo
	25	0,071	0,125	0,098	0,069899	Negativo	Negativo
	26	0,085	0,066	0,0755	0,019166	Negativo	Negativo
	27	0,114	0,114	0,114	0,105975	Negativo	Negativo
	28	0,109	0,1	0,1045	0,084555	Negativo	Negativo
	29	0,08	0,066	0,073	0,013529	Negativo	Negativo
	30	0,045	0,053	0,049	-0,04059	Negativo	Negativo
	31	0,097	0,074	0,0855	0,041714	Negativo	Negativo
	32	0,076	0,096	0,086	0,042841	Negativo	Negativo
	33	0,059	0,062	0,0605	-0,01466	Negativo	Negativo
	34	0,057	0,062	0,0595	-0,01691	Negativo	Negativo
	35	0,091	0,082	0,0865	0,043968	Negativo	Inconclusivo
	36	0,243	0,12	0,1815	0,258174	Negativo	Negativo
	37	0,07	0,324	0,197	0,293123	Negativo	Negativo
	38	0,078	0,064	0,071	0,009019	Negativo	Negativo
	39	0,077	0,071	0,074	0,015784	Negativo	Negativo
	40	0,221	0,16	0,1905	0,278467	Negativo	Negativo
	41	0,109	0,14	0,1245	0,129651	Negativo	Negativo
	42	0,106	0,083	0,0945	0,062007	Negativo	Negativo
	43	0,08	0,075	0,0775	0,023675	Negativo	Negativo
	44	0,091	0,066	0,0785	0,02593	Negativo	Negativo
	45	0,074	0,065	0,0695	0,005637	Negativo	Negativo
	46	0,054	0,066	0,06	-0,01578	Negativo	Negativo
	47	0,089	0,137	0,113	0,10372	Negativo	Negativo
	48	0,069	0,073	0,071	0,009019	Negativo	Negativo

	49	0,08	0,071	0,0755	0,019166	Negativo	Negativo
	50	0,057	0,065	0,061	-0,01353	Negativo	Negativo
	51	0,067	0,057	0,062	-0,01127	Negativo	Negativo
	52	0,072	0,088	0,08	0,029312	Negativo	Negativo
	53	0,109	0,086	0,0975	0,068771	Negativo	Negativo
	54	0,079	0,082	0,0805	0,03044	Negativo	Negativo
	55	0,083	0,067	0,075	0,018038	Negativo	Negativo
	56	0,074	0,072	0,073	0,013529	Negativo	Negativo
	57	0,067	0,074	0,0705	0,007892	Negativo	Negativo
	58	0,065	0,053	0,059	-0,01804	Negativo	Negativo
	59	0,123	0,095	0,109	0,094701	Negativo	Negativo
	60	0,104	0,093	0,0985	0,071026	Negativo	Negativo
	61	0,077	0,073	0,075	0,018038	Negativo	Negativo
	62	0,079	0,088	0,0835	0,037204	Negativo	Negativo
	1	0,083	0,072	0,0775	0,023675	Negativo	Negativo
	2	0,159	0,081	0,12	0,119504	Negativo	Negativo
	3	0,12	0,112	0,116	0,110485	Negativo	Inconclusivo
13	4	0,086	0,07	0,078	0,024803	Negativo	POSITIVO
	5	0,092	0,079	0,0855	0,041714	Negativo	Negativo
	6	0,066	0,074	0,07	0,006764	Negativo	Negativo
	7	0,134	0,113	0,1235	0,127396	Negativo	POSITIVO

Placa 8

Rebanho	Amostra	Absorbância			S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
		1	Absorbância 2	Absorbância Média			
	Controle +	0,659	0,77	0,7145			
	Controle -	0,098	0,07	0,084			
13	8	0,091	0,067	0,079	-0,00793	Negativo	Negativo
	9	0,066	0,084	0,075	-0,01427	Negativo	POSITIVO
	10	0,087	0,07	0,0785	-0,00872	Negativo	Negativo
	11	0,076	0,058	0,067	-0,02696	Negativo	Negativo
	12	0,063	0,069	0,066	-0,02855	Negativo	Negativo
	13	0,065	0,267	0,166	0,130056	Negativo	Inconclusivo
	14	0,135	0,084	0,1095	0,040444	Negativo	Negativo
	15	0,064	0,063	0,0635	-0,03251	Negativo	Negativo
	16	0,057	0,065	0,061	-0,03648	Negativo	Negativo
	17	0,071	0,078	0,0745	-0,01507	Negativo	Negativo
	18	0,767	0,643	0,705	0,984933	POSITIVO	Negativo
	19	0,065	0,073	0,069	-0,02379	Negativo	Negativo
	20	0,093	0,098	0,0955	0,018239	Negativo	POSITIVO
	21	0,108	0,13	0,119	0,055511	Negativo	Inconclusivo
	22	0,239	0,29	0,2645	0,286281	Negativo	Inconclusivo
	23	0,063	0,094	0,0785	-0,00872	Negativo	POSITIVO
	24	0,2	0,204	0,202	0,187153	Negativo	POSITIVO
	25	2,145	2,185	2,165	3,300555	POSITIVO	Negativo
	26	0,052	0,067	0,0595	-0,03886	Negativo	Negativo
	27	0,068	0,1	0,084	0	Negativo	Negativo
28	0,075	0,098	0,0865	0,003965	Negativo	Negativo	
29	0,062	0,073	0,0675	-0,02617	Negativo	Inconclusivo	
30	0,106	0,08	0,093	0,014274	Negativo	Negativo	
31	0,072	0,062	0,067	-0,02696	Negativo	Inconclusivo	
32	0,094	0,058	0,076	-0,01269	Negativo	Inconclusivo	

	33	0,061	0,073	0,067	-0,02696	Negativo	Negativo
	34	0,071	0,072	0,0715	-0,01983	Negativo	Inconclusivo
	35	0,071	0,075	0,073	-0,01745	Negativo	Negativo
	36	0,061	0,077	0,069	-0,02379	Negativo	Negativo
	37	0,077	0,109	0,093	0,014274	Negativo	Negativo
	38	0,088	0,072	0,08	-0,00634	Negativo	Negativo
	39	0,068	0,06	0,064	-0,03172	Negativo	Negativo
	40	0,064	0,059	0,0615	-0,03569	Negativo	POSITIVO
	41	0,116	0,069	0,0925	0,013481	Negativo	POSITIVO
	42	0,067	0,081	0,074	-0,01586	Negativo	Negativo
	43	2,019	1,91	1,9645	2,982554	POSITIVO	Inconclusivo
	44	0,071	0,093	0,082	-0,00317	Negativo	Negativo
	45	0,075	0,141	0,108	0,038065	Negativo	Negativo
	46	0,256	0,251	0,2535	0,268834	Negativo	Negativo
	47	0,092	0,059	0,0755	-0,01348	Negativo	Negativo
	48	0,072	0,062	0,067	-0,02696	Negativo	Negativo
	49	0,111	0,155	0,133	0,077716	Negativo	Negativo
	50	0,051	0,06	0,0555	-0,0452	Negativo	POSITIVO
	51	0,09	0,067	0,0785	-0,00872	Negativo	Negativo
	52	0,069	0,085	0,077	-0,0111	Negativo	Negativo
	53	0,098	0,105	0,1015	0,027756	Negativo	Negativo

Placa 9

Rebanho	Amostra	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância Média	S/P Ratio	Interpretação ELISA	Resultado TCC
	Controle +	0,874	1,02	0,947			
	Controle -	0,091	0,084	0,0875			
13	54	0,143	0,166	0,1545	0,0779523	Negativo	Inconclusivo
	55	0,175	0,116	0,1455	0,0674811	Negativo	Negativo
	56	0,086	0,103	0,0945	0,0081443	Negativo	Negativo
	57	0,102	0,07	0,086	-0,001745	Negativo	Negativo
	58	0,113	0,532	0,3225	0,2734148	Negativo	Negativo
	59	0,149	0,091	0,12	0,0378127	Negativo	Negativo
	60	0,123	0,096	0,1095	0,0255963	Negativo	Negativo
	61	0,084	0,079	0,0815	-0,006981	Negativo	Inconclusivo
	62	0,643	0,472	0,5575	0,5468296	POSITIVO	Inconclusivo
	63	0,097	0,074	0,0855	-0,002327	Negativo	Negativo
	64	0,133	0,124	0,1285	0,0477022	Negativo	Negativo

Conclusão

- Dos 379 bovinos estudados, 10 foram positivos ao ELISA (2,6%);
- Dos mesmos bovinos, 16 foram positivos ao teste cervical comparativo - TCC (4,2%);
- Nenhum animal positivo ao TCC resultou positivo também ao ELISA;
- Dois animais que obtiveram resultado inconclusivo ao TCC, foram positivos ao ELISA.