

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE BOVINOS
INFECTADOS POR *Mycobacterium bovis*

TESE DE DOUTORADO

Carlos Eugênio Soto Vidal

Santa Maria, RS, Brasil
2013

**TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO
DE BOVINOS INFECTADOS POR *Mycobacterium bovis***

Carlos Eugênio Soto Vidal

Tese apresentada ao curso de Doutorado do
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária,
Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Agueda Palmira Castagna de Vargas

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO
DE BOVINOS INFECTADOS POR *Mycobacterium bovis***

elaborada por
Carlos Eugênio Soto Vidal

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Agueda Palmira Castagna de Vargas, Dra. (Presidente/Orientadora)

Eliana Roxo, Dra. (Instituto Biológico de São Paulo)

Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro, Dra. (Universidade Federal de Uberlândia)

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)

Rudi Weiblen, PhD (UFSM)

Santa Maria (RS), 7 de maio de 2013.

AGRADECIMENTO

Agradeço à Prof^a. Agueda, pela orientação.

Ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, que acreditou à distância na proposta, franqueou todas as facilidades para que o projeto tivesse êxito e que me trouxe como um verdadeiro irmão desde que nos conhecemos.

Aos demais colegas de equipe na Embrapa Gado de Corte, especialmente do Laboratório de Imunologia do Setor de Sanidade Animal e da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ-UFMS), cujo clima de colaboração e respeito pelo trabalho focado nos objetivos permitiu que os resultados fossem obtidos.

Aos colegas médicos-veterinários habilitados ao PNCEBT no RS que, anonimamente, colaboraram fornecendo todos os resultados e se submeteram a discussões e exaustivos pedidos de informação.

À equipe do LIPOA, especialmente às Prof^{as}. Helenice de Lima Gonzalez e Eduarda Hallal Duval e à colega doutoranda Priscila Alves Dias, pelo desafio proposto e pelo trabalho realizado.

Aos proprietários dos estabelecimentos de criação, alguns dos quais também confiaram e nos acolheram para que o trabalho ocorresse.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que sob Licença-capacitação, autorizou formalmente este treinamento formal com titulação.

A IDEXX, que doou kits do teste comercial que permitiu o experimento desenvolvido e aos Drs. Walter Ray Waters, que avaliou o projeto e Sílvia Zimmermann, Rafael R. Paiva e Andrea Leão Carneiro Frezza, que ajudaram a entender as possibilidades de uso do kit.

Ao Dr. Scott J. Wells, pelo incentivo e valiosos conselhos de motivação.

À equipe do LABAC, em especial os colegas Jéssica Francielle Camargo, Felipe Libardoni e Denis Spricigo, que participaram com denodo na realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

À Simone, Potira, Catarina e Talita, que sacrifiquei, principalmente com a minha ausência, para que o curso de doutoramento fosse possível. Quando lerem esta tese, saibam que valeu à pena.

E aos meus pais: minha mãe, que me imprimiu caráter estóico, e o meu pai, voluntarioso, com exemplo de sabedoria, serenidade, virtude e cuja piedade com os doentes emocionais aponta na direção da Santidade.

EPÍGRAFE

“Lindo haberlo vivido, p’a poderlo cantar...”

(Pepe Guerra)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE BOVINOS INFECTADOS POR *Mycobacterium bovis*

AUTOR: CARLOS EUGÊNIO SOTO VIDAL

ORIENTADOR: AGUEDA PALMIRA CASTAGNA DE VARGAS
Data e Local da Defesa: Santa Maria (RS), 07 de maio de 2013.

A tuberculose bovina permanece sendo um problema sanitário mundial, tanto aos países em desenvolvimento, quanto aos países já desenvolvidos. A presença da bactéria *Mycobacterium bovis* representa perigo à população bovina e humana e a sua detecção depende de ferramentas diagnósticas, que ainda são imperfeitas. O presente trabalho descreve parte do problema da avaliação do desempenho de dois testes imunoenzimáticos ELISA, um em fase experimental e outro já em estágio comercial para a detecção de anticorpos de bovinos naturalmente infectados por *M. bovis*, quando outras técnicas diagnósticas também falham em acertar no resultado. Mostra também o problema enfrentado pelo limiar definido nacionalmente para o teste cervical comparativo (TCC), que é o método mais amplamente utilizado no controle e erradicação da tuberculose bovina em uso no campo. Vinte e um rebanhos de bovinos, 19 dos quais de produção de leite e dois predominantemente de corte, tiveram testes de tuberculinização comparados aos testes ELISA, aplicados em 2703 amostras de soro, colhidas simultaneamente. O ELISA experimental utiliza como antígeno uma quimera formada por fragmentos de três proteínas de *M. bovis*, MPB-70, MPB-83 e ESAT-6, e o ELISA comercial, a MPB-70 e a MPB-83. O ELISA experimental detectou todos os dez rebanhos e o ELISA comercial nove dos rebanhos positivos pela tuberculinização. O ELISA experimental também detectou mais bovinos como positivos. No segundo artigo, o teste cervical comparativo, que é o teste de referência para o controle da tuberculose, foi analisado em um dos rebanhos, quando o aumento da prega da pele produziu falsos-negativos, prejudicando a tomada de decisão frente ao “ponto-de-corte”. Os falsos-negativos devem ser considerados tanto no controle da doença em criatórios com infecção por *M. bovis*, quanto nos estudos de prevalência, que estão utilizando esse teste.

Palavras-chave: Tuberculose bovina, diagnóstico, ELISA, teste intradérmico, controle.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

DIAGNOSTIC TESTS TO DETECT CATTLE INFECTED BY

Mycobacterium bovis

AUTHOR: CARLOS EUGÊNIO SOTO VIDAL

ADVISOR: AGUEDA PALMIRA CASTAGNA DE VARGAS

Date and Place of the thesis defence: Santa Maria (RS, Brazil), May 7th, 2013.

Bovine tuberculosis remains a global health problem, both for developing countries, as for the developed countries. The presence of the bacterium *Mycobacterium bovis* represents a hazard to human and cattle population and its detection depends on diagnostic tools, which are still imperfect. This thesis describes part of the problem of the performance evaluation of two indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), one in experimental stage and the other a commercial kit to detect antibody of cattle naturally infected by *M. bovis*, when other diagnostic techniques also fail to hit the result. We also show the problem faced by the threshold of the cervical comparative tuberculin (CCT) test, which is the method most widely used for the control and eradication of bovine tuberculosis in field use. Twenty-one herds of cattle, 19 of dairy production and two predominantly for beef production, have been tested with the CCT and the ELISAs' results have been compared, using 2703 serum samples collected simultaneously. The experimental ELISA uses a chimera formed of three proteins fragments of *M. bovis*, MPB-70, MPB-83 and ESAT-6 as antigen, and the commercial ELISA uses the MPB-70 and MPB-83. The experimental ELISA detected all 10 CCT positive herds and the commercial ELISA has detect nine of them. The experimental ELISA also detected more cattle as positive. In the second article, the CCT, which is the reference test for bovine tuberculosis control, was analyzed in a herd, when the skin-fold increase produced false-negative, in detriment of the decision making when the cut-off point is taken to the letter. The false-negative results must be considered both in controlling the disease in farms infected by *M. bovis*, as in surveillance studies using this test.

Keywords: Bovine tuberculosis, diagnosis, ELISA, skin test, disease control

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1 -** (A.) Rebanhos amostrados em cada sub-região do Rio Grande do Sul (colorido), classificadas de acordo com os sistemas de produção de gado, características geográficas, econômicas e sociológicas (Marvulo et al., 2009). (B.) Situação do Rio Grande do Sul no território brasileiro 48
- Figura 2 -** Curvas ROC dos testes ELISA experimental e comercial: áreas sob as curvas ROC (AUC) 49
- Figura 3 -** Resultados de ELISA (razão S/P) por rebanho em gráficos de caixa (“box-plot”): A. experimental; B. comercial. Pontos-de-corte = 0,300 50
- Figura 4 -** Resultados positivos (%) nos 21 rebanhos para os três diferentes testes indiretos no teste cervical comparativo (TCC)■, testes ELISA experimental■ e comercial■: número (n) de amostras testadas por rebanho e linhas de tendência dos testes de imunidade humoral (-----) e celular (-----) nas cinco categorias em que os rebanhos foram agrupados..... 51
- Figura 5 -** Dispersão dos resultados do ELISA experimental (y) versus comercial (x) (razão S/P), por rebanhos (de A a U) e agrupados nas linhas: o ponto-de-corte (0,300) está marcado pelas linhas pontilhadas (verde = experimental; azul = comercial) linha de tendência para regressão linear..... 52

ARTIGO 2

- Figure 1 -** Skin fold measurement of bovine (x) versus avian (y) PPD tuberculins (n = 126) 68

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Quadro 1 -	Intervalos entre testes e número de animais diagnosticados em cada rebanho.....	43
Quadro 2 -	Tabelas de contingência 2 x 2 que confrontam resultados do teste cervical comparativo (TCC), ELISAs experimental (I.) e ELISA comercial (II.) e entre os ELISAs (III.): resultados (A.) e proporções (B.), precisão (sensibilidade – Se e especificidade – Es) e confiabilidade (valores preditivos) (C.), prevalência real, qui-quadrado (McNemar), razão de casualidade, concordância geral, concordância <i>kappa</i> e intervalos de confiança (IC).....	45
Quadro 3 -	Tabelas de contingência 2 x 2 entre lesão sugestiva de tuberculose versus ELISAs experimental (IV.) e comercial (V.) e resultados confirmatórios versus ELISAs experimental (VI.) e comercial (VII.): resultados(A.) e proporções (B.), precisão (sensibilidade– Se e especificidade – Es) e confiabilidade (valor preditivo) (C.), concordância geral, índice de concordância <i>kappa</i> e prevalência real.....	46
Quadro 4 -	Tabelas de contingência 2 x 2 entre testes confirmatórios de tuberculose bovina: (VIII.) Cultura e/ou PCR versus TCC, (IX.) TCC, cultura e /ou PCR versus <i>M. bovis</i> , (X.) TCC, cultura e PCR versus JB (XI.) <i>M. bovis</i> versus complexo <i>M. tuberculosis</i> (CMtb): resultados (A.) e proporções (B.), precisão (sensibilidade– Se e especificidade – Es) e confiabilidade (valor preditivo) (C.), concordância geral, índice de concordância <i>kappa</i> e prevalência real.....	47

ARTIGO 2

Table 1 -	History of herd tuberculosis: intervals between herd tests and number of animals diagnosed and discarded in each herd test.....	66
Table 2 -	Clinical data, slaughterhouse inspection and histopathology findings in 39 animals examined.....	67
Table 3 -	Results of cervical comparative tuberculin (CCT) tests used subsequently twice (108 days apart) in a naturally infected dairy cattle herd by the same officially accredited veterinary practitioner: 2 x 2 table.....	69

APÊNDICES

Tabela 1 -	Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (<i>primers</i> JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMT), <i>M. bovis</i> , complexo <i>Mycobacterium avium</i> (CMA) e <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate.....	78
Tabela 2 -	TCC versus ELISA experimental: resultados das análises estatísticas.....	86
Tabela 3 -	TCC versus ELISA comercial: resultados das análises estatísticas.....	87
Tabela 4 -	ELISA comercial versus experimental: resultados das análises estatísticas.....	88
Tabela 5 -	TCC versus ELISA comercial, versus experimental e experimental versus comercial por categoria: resultados das análises estatísticas.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	–	Bacilos álcool-ácido resistentes
ELISA	–	Ensaio de imunoadsorção de enzima ligada
ESAT-6	–	Alvo antigênico secretório precoce
HRPO	–	Enzima peroxidase (<i>Horse-radish peroxidase</i>)
J	–	Índice de Youden
JB	–	Par de sequências iniciadoras (<i>primers</i>) para PCR em cultura de <i>M. bovis</i>
LANAGRO-MG	–	Laboratório Nacional Agropecuário em Pedro Leopoldo, Minas Gerais
MAC	–	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MAPA	–	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCT	–	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MIF	–	Fator inibidor de macrófagos
MPB-70	–	Proteína imunogênica secretada principal
MPB-83	–	Lipoproteína da superfície da célula
OIE	–	Organização Mundial de Saúde Animal
OPD	–	Ortofenilenodiamina
PBST	–	Fosfato tamponado e polissorbato (<i>Tween</i> ® 20)
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
PNCEBT	–	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
ROC	–	Característica operativa relativa
SAS	–	<i>Statistical Analysis Software</i>
SISBOV	–	Sistema Brasileiro de Rastreabilidade Bovina
SRF	–	Fator reativo da pele
TCC	–	Teste cervical comparativo
TCS	–	Teste cervical simples
TPC	–	Teste da prega caudal
TPF	–	Teste de polarização fluorescente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. ARTIGO 1 – TÍTULO	24
Resumo	24
Abstract	25
Key-words	26
Address	26
Introdução	27
Material e Metodos	29
Resultados	33
Discussão	36
Conclusão	40
Bibliografia	41
3. ARTIGO 2 - TÍTULO	54
Abstract	54
Introduction	55
Material & Methods	57
Results and Discussion	58
Conclusion	62
Bibliography	63
4. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICES	76

1 INTRODUÇÃO

A OIE (2012) considera, para efeito do seu manual, os termos “teste”, “ensaio” e “método de teste” como sinônimos. São procedimentos que, aplicados a animais individualmente ou a rebanhos, podem ter múltiplos objetivos, como classificar a saúde de rebanhos ou o estado imune pós-vacinação, prevenir contra a difusão de doenças por meio do comércio de animais e incluem imunoensaios enzimáticos, teste de reação alérgica *in vivo*, reação em cadeia da polimerase (PCR) etc. A palavra “diagnóstico”, no grego, é um adjetivo, composto do prefixo *dia*, que significa “através”, e *gnosticu*, que significa “relativo ao conhecimento”, e, então, significa “conhecer por meio de”. Em português, o adjetivo passou a ser utilizado como sinônimo do substantivo “diagnose”, que é um processo de análise ou exame de doença ou quadro clínico ou patológico, para o qual se busca uma conclusão. Então, para se chegar a uma conclusão, eventualmente mais de um “método” (diagnóstico) é utilizado, com o objetivo de se aproximar de uma verdade.

Em doenças infecciosas, o método diagnóstico pode ser classificado em direto ou indireto, a depender do objeto que detecta, se o próprio agente etiológico (ou parte dele) ou produtos ou sinais da resposta do hospedeiro ao agente (OIE, 2012). O exemplo mais conhecido de produto de resposta do hospedeiro são os anticorpos e há uma infinidade de testes com todas as possíveis variações, que se adequam diferentemente às situações e objetivos. Para a aproximação de resultados de um teste à verdade sobre aquilo que se quer efetivamente mensurar, e avaliar o desempenho desse teste naquilo que foi medido, os riscos probabilísticos de erros devem ser diminuídos (FLETCHER & FLETCHER, 2005). Recorre-se na maioria das vezes à comparação de resultados com outro teste considerado padrão (*gold-standard*) ou de referência e se mede a acurácia, ou seja, a sensibilidade e especificidade (YERUSHALMY, 1947). Segundo Buck & Gart (1966), a determinação da sensibilidade e especificidade de um teste exigem o conhecimento do

diagnóstico verdadeiro. Quando a determinação de animais positivos e negativos verdadeiros é difícil ou mesmo impossível de estabelecer em relação à população, todos os resultados de sensibilidade e especificidade se tornam incertos. O uso de parâmetros independentes para determinar esses verdadeiros positivos e negativos numa população desconhecida é crucial para evitar vícios de elevar a eficácia do teste (RANSOHOFF & FEINSTEIN, 1978). Por exemplo, numa comparação entre dois testes que medem anticorpos, deve-se considerar que existem animais negativos por ser “não-responsivos”. Mesmo que um grupo verdadeiramente negativo que represente a população que será alvo dos testes exista, muitas vezes não existe um teste disponível para demonstrar isso (GREINER & BÖHNING, 1994). Segundo Tyler & Cullor (1989), mesmo comparando-se testes que avaliam características independentes, os valores de sensibilidade e especificidade não podem ser estabelecidos em base a animais sabidamente positivos e negativos de outra população muito diferente daquela onde o teste será aplicado. A solução proposta foi o termo “co-positividade” e “co-negatividade” para assumir sensibilidade e especificidade (BUCK & GART, 1966). Diversas outras fontes de vícios no desenvolvimento e avaliação de testes diagnósticos estão relacionados a comparar animais infectados experimentalmente e extrapolar os mesmo limites - “pontos-de-corte” - para a população naturalmente infectada. Mais distorcidos ainda são métodos que excluem resultados indeterminados, amostras não-específicas ou que dão lugar a resultados “positivos-falsos” para calcular a acurácia. Testar somente animais claramente definidos dá a falsa impressão de que o teste discrimina bem os resultados e, assim, tem alta sensibilidade e especificidade.

Existem muitos testes diagnósticos que dão resultados numa escala contínua, obtida, por exemplo, em densidade óptica. Para classificar em infectados e não-infectados, um ponto-de-corte nessa escala é adotado, em base a populações, rebanhos ou grupos de referência. O limite muitas vezes é difícil de estabelecer porque os resultados se sobrepõem, principalmente porque ambas as curvas de distribuição terminam necessariamente no infinito, para ambos os lados. Assim, a determinação do

ponto-de-corte se faz sempre ganhando com sensibilidade a expensas da especificidade, e vice-e-versa. A acurácia do teste é tanto maior quanto mais exclusivas, separadas ou distantes entre si forem as curvas (BARAJAS-ROJAS et al., 1993; GREINER et al., 1994).

Essa escala contínua em densidade óptica obedece a leis da fotoquímica, de Lambert-Beer, que faz com que a quantidade de luz resultante da absorção com indicador de cor na reação de oxi-redução aumente em escala logarítmica (CROFTS et al., 1988). Para tratar os dados de forma linear e tornar as variâncias dos grupos mais homogêneas, deve-se buscar uma transformação da escala dos resultados da densidade óptica. Um problema de resolução matemática difícil é o fato de que o zero é um valor artificial mais baixo adotado no espectrofotômetro (VIZARD et al., 1990).

Ransohoff & Feinstein (1978) destacaram que a pergunta que mais comumente os veterinários (ou proprietários) se fazem frente a resultados de testes é: se o resultado é esse (positivo ou negativo), qual é a certeza que se pode ter (de infecção ou não-infecção, respectivamente). A resposta para esta pergunta é o valor preditivo (ou menos usual, mas mais compreensível, valor “previsto” ou “previsível” ou “preditor”, positivo ou negativo). As perguntas cujas respostas são a sensibilidade e especificidade são: se o animal está infectado, qual é a probabilidade de que venha com o resultado positivo (para sensibilidade)? Como os valores previstos são calculados na horizontal, em tabelas de contingência 2 x 2, nas quais se coloca a verdade no topo, dividida nas colunas e os resultados do teste divididos nas linhas, eles são influenciados pela prevalência, o que não ocorre na sensibilidade e especificidade, que são medidas na vertical, independentes dentro das específicas populações (sabidamente positiva e negativa). A certeza de positivos, ou seja, o valor preditivo positivo é alto em altas prevalências (e vice-e-versa para o valor preditivo negativo). Porém a confiabilidade do teste, que são os valores preditivos, não é melhorada colocando-se animais mais definitivamente positivos ou negativos, pois o que ocorre é um vício (ou viés) na avaliação do desempenho.

Para algumas doenças infecciosas, o desenvolvimento e a avaliação de testes indiretos são um problema, porque além de não existirem testes-padrão, nem baterias de

amostras de referência para cada população específica, a doença e a resposta produzida contra ela pelo hospedeiro sofrem uma multiplicidade de variações que vão desde o estágio da infecção, até influências nutricionais e fisiológicas a que os hospedeiros estão sujeitos (LLOYD, 1983).

Mycobacterium bovis é a bactéria causadora da tuberculose bovina, que é uma doença infectocontagiosa crônica, insidiosa, que se caracteriza pela formação de lesões granulomatosas, principalmente no trato respiratório e nos linfonodos a ele associados. A bactéria também pode causar doença em outras espécies de animais, inclusive o homem (THOEN et al., 2006) e é prevalente em todo o mundo (ETTER et al., 2006). A tuberculose humana atingia enorme parte da população mundial no século XIX e reputa-se a redução da prevalência a pelo menos duas medidas importantes, que foram a colocação dos doentes humanos em sanatórios, eventualmente para morrerem lá, e a pasteurização do leite e inspeção do leite e da carne bovina (FAIRCHILD & OPPENHEIMER, 1998; ANTUNES et al., 2002). A não detecção de amostras de *M. bovis* em amostras de tuberculose humana está relacionada ao fato de que a diagnose não está direcionada nesse sentido (KANTOR et al., 2010). Assim, Rocha et al. (2011) não obtiveram nenhuma amostra de *M. bovis* de humanos em amostras brasileiras. A tuberculose, entretanto, ainda está presente em países onde a bovinocultura é tecnicamente desenvolvida (AMANFU, 2006).

O controle da doença em bovinos depende de testes diagnósticos aplicados individualmente aos animais, de forma a identificar os infectados que, ainda que não desenvolvam doença, são potenciais fontes de infecção e devem ser eliminados do rebanho, visto que as vias de transmissão são muito diversas e sobre estas o controle é ainda mais difícil (HUMBLET et al., 2009; SKUCE et al., 2011). O teste mais largamente utilizado no mundo inteiro é a reação intradérmica à tuberculinização (MONAGHAN et al. 1994) e tem por fundamento a hipersensibilidade tardia tipo IV (BLACK, 1999).

A reação de hipersensibilidade tardia ou reação tipo IV, geralmente ocorre 24 a 48 h após o antígeno ter contato com o corpo do hospedeiro. O mecanismo da reação de tipo

IV no local da inoculação do antígeno (derivado protéico purificado - PPD) inicia-se pela sua distribuição rápida a partir do local da inoculação e é fagocitado por macrófagos. Somente 10 a 20% desse antígeno inicialmente inoculado resta no local da inoculação após 5 h. A liberação de linfocinas resulta da reação de linfócitos T especificamente sensibilizados a antígenos. Uma inflamação e acúmulo de células mononucleares ocorrem no local da inoculação. Nesta primeira fase, há apenas pouca inflamação, sem diferenças entre animais normais e os hipersensibilizados. Mais tarde, o local da injeção começa a se tornar endurecido e o eritema é maximizado entre 24 e 48 h pós-inoculação, quando principalmente linfócitos e macrófagos são infiltrados no ponto de inoculação. As linfocinas liberadas nas primeiras horas da reação pelos linfócitos T sensibilizados, principalmente o Fator de Inibição da Migração de macrófagos (do inglês, MIF), inibirão a migração de macrófagos, mas o MIF não tem efeito sobre a migração de células polimorfonucleares. Além disso, a liberação de Fator Reativo da Pele (do inglês, SRF) estimula a inflamação local e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Assim, o endurecimento é considerado máximo às 72 h pós-inoculação, que é o ideal para a leitura do teste em bovinos (LEPPER et al., 1977).

Os testes de tuberculinização estão sujeitos a diversas fontes de variação (MONAGHAN et al., 1994). HUMBLET et al. (2011) estudaram por meio de questionários a forma como os testes estavam sendo realizados na prática dos veterinários na Bélgica e constataram imperfeições em 100% deles, que levariam a erros extrínsecos ao teste.

Entretanto, alguns animais deixam de reagir, devido à chamada anergia. Anergia é a falha que ocorre em animais com evidência de infecção por *M. bovis* de demonstrar aumento de volume no local de inoculação de tuberculina (prega da pele) no momento da leitura. Fatores estressantes como a parição, desnutrição, cansaço e transporte reduzem a reatividade à tuberculinização. Outros fatores imunossupressores, como a leucose bovina, poderiam favorecer tanto a ocorrência de doença, quanto a confusão no diagnóstico clínico e a anergia (SLEDGE et al., 2009). Acredita-se que a anergia aos testes intradérmicos no peri-parto aconteça em consequência da remoção de linfócitos B

fixos na pele para a circulação geral e para o colostro (RADOSTITS et al., 1994). Os linfócitos B, juntamente com as células dendríticas mielóides (DC1), têm a função apresentadora aos linfócitos Th1 (TIZARD, 2008). A resposta mediada por linfócito Th1 e Th2 aumenta quando os bovinos positivos nos testes intradérmicos são estimulados com PPD (BLANCO et al., 2009). Quevillon et al. (2013) propuseram que as porcentagens de linfócitos T CD8+, células B e os níveis de ativação de células T serão biomarcadores para as fases da infecção.

Lepper et al. (1977) verificaram que a diminuição da dose de tuberculina de 0,2 para 0,1 mg aumentou o número de anérgicos, assim como a leitura às 96 h pós-tuberculinização teve mais anérgicos do que às 48 e 72 h. Vale destacar que a dose de tuberculina PPD bovina utilizada no Brasil é de 0,1 mg (BRASIL, 1994). A anergia, se local e/ou “circulatória”, parece ainda não estar bem compreendida (RHODES et al., 2000). O uso dos testes diagnósticos intradérmicos para a tuberculose, portanto, pode não ser capaz de detectar e, por conseguinte, excluir a persistência de bovinos infectados. Ao contrário, na tuberculose bovina, os anérgicos, cujos sistemas imunológicos estariam completamente ocupados em respostas maciças à doença (anergia por exaustão), deixariam de reagir aos testes intradérmicos. Ao serem testados, têm resultados negativos e, assim, permanecem no criatório, servindo de fonte de infecção aos demais. Por este motivo, os testes realizados em paralelo nos bovinos dentro dos criatórios e em série ao longo das etapas de saneamento não conseguem detectá-los (PLACKETT et al., 1989).

O maior inconveniente na anergia ocorre quando a prevalência do criatório é alta e se inicia o controle e a eliminação dos reagentes-positivos aos testes intradérmicos, o que termina por “selecionar” eventuais anérgicos, que permanecem como fontes de infecção aos demais, apesar dos testes em série, pois os anérgicos não voltam a reagir e, assim, não são detectados. Nas fases adiantadas do controle, os anérgicos já seriam uma minoria, mas da mesma forma “silenciosa”, mantém a doença, tanto infectando o ambiente quanto as gerações que se seguem. Recentemente, ficou demonstrado que o

uso continuado da tuberculinização nos bovinos pode selecionar indivíduos que geneticamente não respondem à reação intradérmica (AMOS et al., 2013).

Para substituir os testes intradérmicos, diversos testes foram desenvolvidos e avaliados. Um desses testes é o do interferon-gama (GORMLEY et al., 2006; MARASSI et al., 2010). Este teste avalia *in vitro* a imunidade celular, para medir linfocinas após o co-cultivo de sangue completo, portanto contendo linfócitos, e um antígeno específico de *M. bovis*. A acurácia do interferon-gama é comparável ao teste (intradérmico) cervical comparativo, com vantagens de dispensar duas visitas à propriedade, juntar animais duas vezes, mas desvantagens de utilizar sangue colhido até 48 h, idealmente 6 h (VEERASAMI et al., 2011), mais a necessidade de apoio laboratorial e o custo do teste. A solução para isto pode ser um sistema de coleta e logística que faça chegar amostras bem conservadas, quando o laboratório já esteja avisado para recebê-las e, para diminuir o custo, um sistema com antígenos nacionais teria que ser usado (ARAÚJO, 2011).

Os testes ELISA para a imunidade por anticorpos também já foram desenvolvidos em grande número, mas as restrições são maiores, uma vez que a acurácia é baixa e as avaliações têm sido realizadas em pequeno número de amostras e estas quase sempre favorecendo o teste, com evidências de serem muito marcadamente negativas ou positivas, diferentemente do que se encontra na condição da realidade, na qual os testes são utilizados, ou eventualmente, em populações muito diferentes para outras possíveis populações-alvo. Reações inespecíficas podem confundir inclusive grupos tidos como de referência (BUDDLE et al., 2010). Mesmo assim, apesar de depender da fixação do complexo antígeno e anticorpos à parede da microplaca e uma sequência de etapas de incubações e lavagens e controle de condições ao longo do tempo, os testes ELISA continuam sendo uma opção complementar à tuberculinização (LILENBAUM & FONSECA, 2006; WATERS et al., 2011), assim como outros testes, tais como o *dipstick*, no qual os antígenos, incluindo MPB-70, ESAT-6 e CFP-10, são fixados numa fita (MOSAAD et al., 2012).

A combinação de antígenos e o uso de proteínas recombinantes que associaram

a proteína A da membrana externa de *M. tuberculosis* OmpATb Rv0899 ao ESAT-6 e CFP-10 foi a alternativa relatada por Schiller et al. (2009) para alcançar a mesma acurácia dos testes intradérmicos com PPDs. Whelan et al. (2008) desenharam um teste que inclui 25 antígenos de *M. bovis* e o resultado foi sensibilidade de 93,1% e especificidade de 98,4%. Buddle et al. (2009) destacaram que testes auxiliares à tuberculinização, usando estes e outros antígenos, tanto para interferon-gama quanto ELISAs para anticorpos e testes intradérmicos, são as possibilidades que o veterinário oficial responsável pela área escolhe segundo a situação encontrada, na Nova Zelândia, Espanha, Itália e Alemanha (SCHILLER et al., 2010). A fusão de epítomos numa mesma molécula também já foi ensaiada (LIU et al., 2007).

O teste de polarização fluorescente (TPF) para identificar bovinos cujos níveis de anticorpos no soro sanguíneo contra a bactéria são detectáveis está disponível comercialmente em outros países e em alguns deles em fase de validação (JOLLEY et al., 2007). O TPF, além da vantagem de não depender de lavagens sucessivas, é por isto mais rápido, independe da adsorção de antígenos e do complexo com os anticorpos à superfície de uma microplaca (“fase sólida”) como os testes ELISA, pois é um teste realizado em “fase líquida” e tem sido provado tão eficaz quanto outros testes celulares e sorológicos para detectar bovinos infectados por *M. bovis* e outras bactérias causadoras de doenças importantes de bovinos (LIN et al., 1996). A limitação tecnológica do TPF é que antígenos menores devem ser preferencialmente usados, com preferência a peptídeos (WEI & HERRON, 1993; JOLLEY & NASIR, 2003), cujos custos de síntese são altos.

O TPF disponível comercialmente no exterior para a tuberculose bovina utiliza a fração F-733 da proteína MPB-70 e está patenteado pelo fabricante (SUGDEN et al., 2000). Ademais, já se sabe que, a despeito de que esta proteína é bastante específica para a resposta a *M. bovis*, esta resposta somente aparece muitas semanas após a infecção. Por este motivo, outra proteína (MPB-83), a quem a resposta humoral aparece em duas a quatro semanas pós-infecção (WATERS, et al., 2006), mas desaparece na

resposta tardia, está sendo incluída no TPF (SURUJBALLI et al., 2009), porém ainda não está disponível comercialmente. O teste, caso fosse provada sua acurácia, poderia apoiar com vantagens os testes intradérmicos. O TPF para anticorpos anti-*M. bovis* tem, entre as vantagens, ser teste de fase líquida e que pode até ser feito rapidamente “ao pé-da-vaca” (“cow-side test”). Entretanto, poucas avaliações parecem ter sido realizadas independentemente do fabricante. Müller et al. (2009) compararam o TPF ao TCC utilizando 954 bovinos em abatedouro e verificaram sensibilidades abaixo de 50% e especificidades acima de 90%. Hipotetiza-se que, durante a resposta, antígenos solúveis como derivados do MPB-70 possam estar momentaneamente adsorvendo anticorpos específicos e por isto eles não apareçam nos testes diagnósticos (KOSTOVIC, 2013: comunicação pessoal).

Tornou-se consenso que os programas de controle da tuberculose e outras doenças devem partir dos matadouros, rastreando-se os animais até a sua origem (AMANFU, 2006). Porém, isto demanda um sistema de identificação individual dos animais que permita rastreabilidade e, ao menos no Brasil, a organização desse sistema até o momento não foi dirigida com este fim de utilidade. O simples aumento do tamanho dos rebanhos determina o aumento do risco da ocorrência da tuberculose bovina (BROOK-POLLOCK & KEELING, 2009). Para agravar, a bovinocultura brasileira tem uma dinâmica muito grande, que vai da constante importação de animais, aos seguidos fechamentos de matadouros. O aumento dos rebanhos é visto como um direito e uma oportunidade de ganho em escala, que se impõe, e não como uma estratégia para diminuir o risco sanitário da atividade. Assim, estratégias alternativas no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) são vistas como mudanças de curto prazo, que instabilizariam as medidas de longo prazo. Sabe-se que foram tais mudanças que prejudicaram até o momento a implantação de um sistema de rastreabilidade (SISBOV) factível e confiável. Mesmo com a atual estratégia (VALENTE et al., 2009) ou outras, o controle da tuberculose no Brasil não prescindirá de métodos diagnósticos individuais de boa acurácia, praticidade e baixo custo relativo,

nem do uso do SISBOV funcionando perfeitamente.

Apesar de serem consideradas confirmatórias, a macroscopia, histopatologia, bacterioscopia e bacteriologia são técnicas cujos resultados dependem muito de padronização (ARAÚJO et al., 2004), pois, em alguns casos, a sensibilidade é muito baixa. Fráguas et al. (2008) utilizaram 97 animais reagentes-positivos ao TCC, cujas macroscopias tiveram 72/97 de sensibilidade e a histopatologia 90% de concordância (de positivos) com a macroscopia, porém o isolamento teve sensibilidade de apenas 11/97 animais. No ELISA, a sensibilidade foi de 34%, o que não significa que a especificidade, se testada, seria razoável. Assim, a colheita de linfonodos nos animais em matadouro com finalidade de confirmar positivos e negativos também depende de esforço e precisão. Testes imunomagnéticos recentemente desenvolvidos são ferramentas promissoras (STEWART et al., 2013), que talvez forcem à rastreabilidade para o combate mais eficaz à doença, indicando os rebanhos infectados, onde técnicas *in vitro*, sorológicas, interferon, TCC associadas terão que ser integradas.

Técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e/ou automatizada para testar maior número de amostras permitem viabilizar o diagnóstico confirmatório de certeza (direto, ou seja, detectando-se o próprio agente etiológico da doença ou parte dele, neste caso, os ácidos nucléicos). Entre as vantagens da PCR em tempo real em relação às demais cabe mencionar que a amplificação pode ser monitorada no momento em que está acontecendo (em “tempo real”), requer 1.000 vezes menos DNA que os demais ensaios (3 picogramas = 1 genoma), o método não é influenciado por amplificações não-específicas de sondas, é mais específico, sensível e reproduzível, os ciclos são mais rápidos, faz maior extensão dinâmica de até 10^{10} vezes, confirma a amplificação específica por meio da análise da curva de mistura e não é muito mais caro que a PCR convencional, exceto considerando-se o preço do equipamento. Entretanto, a PCR em tempo real exige muita habilidade e boa capacitação.

Vacinas contra a tuberculose bovina poderiam ser usadas em duas circunstâncias extremas que são países subdesenvolvidos que não conseguem gerenciar programas

sanitários que reduzam a prevalência com o uso de testes diagnósticos, rebanhos e áreas livres e, no outro extremo, países desenvolvidos que, muito próximos da erradicação, teriam que vacinar animais silvestres aos quais a infecção está reservada. Somente se fosse o caso de se alcançar a possibilidade de vacinas diferenciais, ambos, testes e vacinas, poderiam ser usados conjuntamente. Enquanto tal possibilidade parece distante, o conhecimento para o uso de testes continua sendo a melhor saída.

Esta tese teve como objetivos avaliar a acurácia de dois testes ELISA utilizando proteínas recombinantes de *M. bovis* para detectar a presença de animais infectados. Amostras que representassem a realidade dos sistemas de criação, com uma variabilidade razoável, próxima da que ocorre na maioria dos rebanhos, em controle e fora dele, na condição natural de infecção em área prevalente foram obtidas. Postulou-se que testes de imunidade humoral revelam animais que não respondem aos testes de imunidade celular (RITACCO et al., 1991). Também aborda um problema do teste nacional e internacionalmente mais usado, que é o teste cervical comparativo, que oportuniza aos veterinários a tomada de decisão, mas determina pontos-de-corte que, se forem levados à risca, podem produzir resultados falso-negativos, quando o aumento de ambos locais de inoculação, da tuberculina PPD bovina e aviária se igualam ou ficam muito próximos.

2 ARTIGO 1

Dois testes imunoenzimáticos ELISA para detectar anticorpos de bovinos naturalmente infectados por *Mycobacterium bovis*

VIDAL, C. E. S.*; ARAÚJO, F. R.; VARGAS, A. C.

(a ser submetido à publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira ou outro periódico científico sob consideração da banca)

RESUMO

Dois testes ELISA indiretos, um em fase experimental e outro já disponível comercialmente e registrado junto à Organização Mundial de Saúde Animal (O.I.E.), foram avaliados em amostras de campo para detectar anticorpos de bovinos infectados por *Mycobacterium bovis*, além daqueles que os testes cervicais comparativos atualmente regulamentados para o controle da tuberculose bovina detectaram. O ELISA experimental utiliza como antígeno uma quimera formada por partes das proteínas MPB-70, MPB-83 e ESAT-6 e o ELISA comercial utiliza MPB-70 e MPB-83. Vinte e um estabelecimentos de criação de bovinos localizados no estado do Rio Grande do Sul, com histórico de ocorrência de tuberculose bovina ou certificados livres da doença foram testados por tuberculinização e 2703 amostras de soro colhidas simultaneamente pelos respectivos veterinários habilitados. Os resultados dos dois ELISAs foram comparados aos dos testes cervicais de cada bovino. Para determinar a presença ou não de infecção nos indivíduos e nos estabelecimentos de criação, 147 (5,4%) bovinos abatidos de 9 (42,8%) dos rebanhos foram analisados em relação a lesões, cultura e reações em cadeia da polimerase (PCR), tanto das culturas em que houve crescimento quanto diretamente das amostras de linfonodos. Os testes ELISA detectaram como positivos outros bovinos (16,6 e 13,0%, para o ELISA experimental e comercial, respectivamente), em geral diferentes, além daqueles que os testes cervicais

comparativos detectaram (prevalência aparente = 4,4%) para a prevalência verdadeira calculada de 4,4%. Entretanto, resultados positivos nos ELISAs foram obtidos também nos seis rebanhos certificados livres de tuberculose. Em um destes rebanhos, que tinha histórico de há mais de 5 anos ter tido bovinos doentes, foi possível confirmar resultado positivo por meio de PCR. Os ELISAs experimental e comercial comparados entre si detectaram bovinos diferentes e indicaram prevalências distintas para os rebanhos. O ELISA experimental detectou mais animais como infectados, o que pode significar mais reações inespecíficas, mas, por outro lado, detectou 100% dos rebanhos positivos à tuberculinização. Porém, o ELISA comercial deixou de detectar um rebanho positivo à tuberculinização e que se comprovou infectado ao menos por tuberculinizações, lesões ao abate e histopatologia, mas em compensação detectou mais animais como positivos nos rebanhos que pareciam negativos conforme o teste cervical comparativo. Nos animais abatidos, quando as referências foram bovinos com lesões e confirmados por cultura ou PCR, a sensibilidade dos ELISAs foi menor do que 30%. Os resultados de anticorpos detectados por meio de ambos os testes ELISA permitiram comprovar que a erradicação da tuberculose e mesmo a certificação a partir de rebanhos livres dificilmente ocorrerá utilizando-se somente testes de tuberculinização e sugerem que a exclusão de bovinos infectados demandará também a detecção de anticorpos por meio de testes com alta sensibilidade.

PALAVRAS-CHAVE

Tuberculose bovina, diagnose, métodos diagnósticos, MPB-70, MPB-83, ESAT-6

**Two enzyme-linked immunosorbent assays
to detect antibodies of cattle naturally infected by
*Mycobacterium bovis***

VIDAL, C. E. S.*; ARAÚJO, F. R.; VARGAS, A. C.

ABSTRACT

Two indirect ELISA tests, one in an experimental stage and another already commercially available and registered at the OIE, were evaluated in field samples to detect antibodies of cattle infected with *Mycobacterium bovis*, and compared to those detected by comparative cervical tuberculin (CCT) tests currently regulated for bovine tuberculosis control and eradication. The experimental ELISA uses as antigen a chimera formed by parts of the proteins MPB-70, MPB-83 and ESAT-6 and the commercial ELISA uses MPB-70 and MPB-83. Twenty-one herds located in the state of Rio Grande do Sul, with a history of bovine tuberculosis occurrence or certified-free of tuberculosis were tested by tuberculin and 2703 serum samples collected simultaneously by the accredited veterinary practitioners. The results of both ELISAs were compared to the results of the cervical tests of each animal. To determine the presence or absence of infection in individuals and herds, 147 (5.4%) cattle slaughtered from 9 (42.8%) of the herds were analyzed in relation to lesion, culture and polymerase chain reaction (PCR) results, both from cultures and/or directly from lymph nodes. The ELISA detected as positive other cattle (16.6 and 13.0%, for the experimental and commercial ELISA, respectively) in general different than those which the CCT tests have detected (apparent prevalence = 4.4%) for calculated true prevalence of 4.4%. However, positive results in ELISAs were also obtained in the 6 herds certified free of tuberculosis. In one of these flocks, which had a history of more than five years having had diseased cattle, two animals were confirmed positive by the PCR. The experimental and commercial ELISAs compared to each other detected different cattle and indicated distinct herd prevalences. The experimental ELISA detected more animals as infected, which may mean more nonspecific reactions, but on the other hand, detected 100% of the tuberculin positive herds. However, the commercial ELISA failed to detect a tuberculin positive herd that was proved to be infected by at least tuberculin, lesions at slaughter and histopathology, but it detected more positive animals in herds that tested negative at the CCT. In slaughtered animals, when the references were the animals with tuberculosis lesions confirmed by culture or PCR, sensitivities of the ELISAs were less than 30%. The results of antibodies detected by both ELISAs allowed proving that the eradication of tuberculosis and even the accreditation of herds and areas as free from bovine tuberculosis will hardly occur using only tuberculin tests and suggest that the exclusion of infected cattle also require detection of antibodies by tests with high sensitivity.

KEY-WORDS

Bovine tuberculosis, diagnosis, diagnostic methods, MPB-70, MPB-83, ESAT-6

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infectocontagiosa crônica, causada por *Mycobacterium bovis*, que também pode acometer humanos e, por isto, é considerada uma zoonose de alto impacto (Amanfu 2006, Etter et al. 2006). A detecção e a exclusão de bovinos infectados com *M. bovis* têm sido utilizadas pelos países que conseguiram reduzir a prevalência da infecção, tornando estabelecimentos de criação e zonas geográficas livres da tuberculose bovina. Além disso, não existem tratamento nem vacina viáveis até o momento para prevenir a infecção nem a doença em bovinos.

No Brasil, os testes oficiais para detecção da tuberculose em bovinos baseiam-se na mensuração da reação de hipersensibilidade tardia, por meio da tuberculinização (Brasil 2004). Esses testes consistem na injeção intradérmica de tuberculinas (PPD) (Brasil 1994), e têm sido amplamente usados para eliminar a infecção em rebanhos. Entretanto, a limitação dos testes intradérmicos é que têm por base a imunidade celular, que demora alguns dias a partir da infecção até que possa ser detectada e, ao longo do tempo, pode desaparecer em alguns bovinos, o que os torna falso-negativos (Monaghan et al. 1994).

Testes sorológicos têm sido propostos experimentalmente como alternativas suplementares aos testes intradérmicos para detectar bovinos infectados por *M. bovis* (Schiller et al. 2010; Strain et al. 2011). Porém, existem algumas limitações à erradicação por meio da eliminação de animais com base neste tipo de teste, dentre as quais se destacam a alternância entre as respostas humoral e celular (Harboe et al. 1990; Ritacco et al. 1991; Welsh et al. 2005); as fases da infecção nas quais não se consegue detectar as respostas imunes nos bovinos (Ritacco et al. 1991); e aos antígenos utilizados nos testes, visto que o genoma de *M. bovis* é constituído por aproximadamente 4 mil genes codificantes para proteínas, e muitas delas são comuns a micobactérias não-patogênicas (Garnier et al. 2003).

Os antígenos mais frequentemente apontados para serem utilizados em testes diagnósticos na detecção de anticorpos contra *M. bovis* têm sido as proteínas MPB-70, MPB-83 (Wiker, 2009) e ESAT-6 (Pollock et al. 1996; Vordermeier et al. 2001; Mosaad et al. 2012). MPB-70 é uma proteína solúvel e parece ter resposta de anticorpos em fases tardias à infecção por *M. bovis*, enquanto MPB-83 é uma lipoproteína da parede da bactéria e os anticorpos contra ela aparecem em fases precoces da infecção (Waters et al. 2006), assim como ocorre contra a ESAT-6 (Lyashchenko et al. 1998). Portanto, para estimar quais animais estão infectados, mais de um antígeno deve ser utilizado (Pollock et al. 1996).

Um grupo de pesquisa utilizou estes antígenos produzidos por recombinação, além de 6 outros (CFP-10, PE5, MPB63, MB0143, TB10.4 e TB15.3), em ELISA que foram comparados num teste de triagem em estabelecimentos de criação certificados livres e outros estabelecimentos de criação com bovinos naturalmente infectados com *M. bovis* (Souza et al. 2012). Apesar de se obter boa concordância quando o teste é padronizado com amostras definidas, os testes sujeitos a amostras do campo geralmente têm desempenho inferior (Greiner & Gardner, 2000). Os testes diretos, como cultura e PCR

e métodos imunomagnéticos estão sendo também melhorados e se espera que o seu uso mais amplo como ferramenta de vigilância seja possível em breve, inclusive como confirmador de métodos automatizados, como a própria sorologia (Stewart et al., 2013).

Este estudo teve como objetivo avaliar um ELISA indireto experimental, cujo antígeno utilizado é uma quimera composta das proteínas MPB-70, MPB-83 e ESAT-6 de *M. bovis*, comparando-se a um ELISA indireto comercial registrado e aprovado pela O.I.E. (OIE, 2012a) e testes cervicais simples (TCS) e comparativos (TCC), para detectar bovinos infectados por *M. bovis* em estabelecimentos de criação infectados e certificados livres de tuberculose bovina.

MATERIAL & MÉTODOS

Experimento: Um estudo transversal foi realizado em 21 estabelecimentos de criação, 19 dos quais eram rebanhos leiteiros e os outros dois, predominantemente, de corte (rebanhos M e O), situados em cinco das sete sub-regiões em que o Rio Grande do Sul foi dividido (Marvulo et al. 2009) (Figura 1). Além da concordância individual e a prevalência aparente com os testes de tuberculinização, a proporção de resultados reagentes-positivos nos testes de ELISA indiretos e lesões relacionadas à tuberculose na inspeção ao abate foram consideradas como variáveis-resposta. Assim, durante a pesquisa alguns animais foram acompanhados no abate, para colheita de amostras de linfonodos, tecidos de órgãos, com ou sem lesões granulomatosas para cultura de micobactérias e reações em cadeia de polimerase (PCR) em colônias isoladas ou diretamente das amostras de tecido.

Rebanhos estudados: os rebanhos foram selecionados por conveniência, ou seja, aqueles nos quais existiram ou não bovinos reagentes-positivos em testes diagnósticos para a tuberculose bovina (teste cervical comparativo = TCC e teste cervical simples = TCS), ou outros rebanhos certificados livres ($n = 6$), todos com a colaboração espontânea de veterinários oficialmente habilitados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Estes 15 médicos veterinários forneceram os resultados da medição da espessura da pele dos testes (dobra-de-pele a partir dos locais de inoculação da tuberculina), cópias dos resultados dos testes oficiais e amostras de soro sanguíneo dos indivíduos testados de cada rebanho. Em rebanhos certificados-livres, as amostras de soro foram principalmente aquelas de vacas com mais de 24 meses de idade. Os rebanhos encontravam-se em diferentes fases do controle da tuberculose bovina. Os resultados incluíram testes em mais de 3 mil bovinos, durante 3 anos. Os rebanhos certificados como livres foram testados negativos, pelo menos três vezes. Todos os bovinos com mais de 6 semanas de idade foram tuberculinizados, exceto fêmeas entre 15 dias antes até 15 dias após o parto.

Testes diagnósticos: os resultados dos TCS e/ou TCC, realizados como rotina por médicos veterinários oficialmente habilitados, foram analisados e classificados como reagentes-positivos ($\geq 4,0$ mm), inconclusivos ($\geq 2,0$ e $< 4,0$ mm) ou negativos ($< 2,0$ mm), segundo os parâmetros do PNCEBT (Brasil, 2004). Para efeito destas análises, os

resultados inconclusivos foram considerados como negativos, e foi positivo quando apresentou resultado inconclusivo por duas vezes consecutivas.

ELISA indireto. Um ELISA *experimental*, cujo antígeno é uma quimera, foi realizado de acordo com Souza et al. (2012). Resumidamente, o antígeno (diluição de 1 : 5.000 da solução de estoque) foi adsorvido em placas de poliestireno de 96 poços (Costar 3590), com 100 µl/cavidade diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, o antígeno foi desprezado e as placas foram bloqueadas com 100 µl/poço PBST (0,15 M de tampão de fosfato pH 7,2 com 0,01% de Tween 20) e leite em pó desnatado 5% por 1 h a 37 °C. Após cinco lavagens das placas com PBST, as amostras de soro a ser testadas (100 µl/poço), diluídas em PBST (1 : 600) com 2% de leite em pó desnatado, foram incubadas durante 1 h a 37 °C. As placas foram, então, lavadas cinco vezes com PBST e o conjugado anti-IgG de bovino de coelho com peroxidase (Sigma, A5295) (100 µl/cavidade) diluído (1 : 10.000) em PBST, foi adicionado às placas. As placas foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C e depois de cinco lavagens com PBST, a mistura do cromógeno OPD (Sigma, P9187) em água destilada ultra-pura e o substrato H₂O₂ (50 µl/poço) foram adicionados. A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ (2,5 N) e os resultados foram lidos num espectrofotômetro (leitor de placas de 96 poços) marca Bio-Tek modelo EL-800, utilizando o filtro 490 nm. Os controles intra e inter-testes realizados segundo a metodologia descrita por Ramanakumar et al. (2010) com as seguintes modificações: no controle intra-teste, todas as amostras foram analisadas em duplicata, e para o controle de inter-teste, duas amostras de controle negativo e as duas amostras de controle positivo em cada placa de 96 cavidades foram colocados, em triplicata, por placa. Mediu-se o coeficiente de variação (CV) de duplicatas e triplicatas. No caso das amostras de controle, quando o CV era maior do que 10% entre triplicatas, a triplicata mais distante da média era eliminada e novo CV seria calculado e a aceitação da média dependia de CV < 10%. No caso de amostras de ensaio (em duplicata), uma amostra que tinha o seu CV entre os resultados maior a 10% tinha que ser repetida com um novo ensaio. A média das amostras de controle negativo eram subtraídas da média do teste em duplicata (S) e da média das amostras de controle positivo (P) e a razão entre os resultados destas diferenças (S/P) foi o resultado final do ELISA. Um ponto-de-corte entre resultados positivos e negativos para o ELISA *experimental* seria decidido nessa escala da razão S/P, tal que os resultados da amostra igual ou maiores do que o ponto-de-corte determinariam um animal reagente-positivo e os demais, negativos.

ELISA comercial.¹ O *IDEXX M. bovis antibody test kit*® (OIE, 2012b) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os reagentes eram mantidos refrigerados e, no dia anterior ao experimento, foram colocados em estufa a 25 °C para ser mantidos na temperatura de 18-26 °C durante todo o tempo do ensaio. Na noite anterior, o *lay-out* das placas a serem usadas no dia seguinte foi definido. Todos os reagentes foram misturados por agitação suave, bem como as amostras. A placa impregnada de antígeno foi retirada da embalagem, pelo menos, 2 horas antes do

1 **Fonte Aquisição:** 1448735576 Invoice IDEXX, Netherlands; Import License 12/1354114-4 SISCOMEX, Brasil; 900008790 CNPq, Brasil; 1.223/2012 CPV/DFIP/SDA/MAPA, Brasil.

ensaio. Todas as amostras foram testadas em um poço único, ou seja, sem duplicata, condição considerada aceitável pelo fabricante. As diluições foram realizadas em uma microplaca nova de 96 poços (Polysorp, Agilent, Nunc®, EUA), 196 µl + 4 µl (1 : 50) de amostra de soro. As amostras de controle fornecidas pelo *kit* também foram diluídas na mesma microplaca (100 µL) e colocadas em duplicata, nos poços indicados (1A e B; e 1C e D). Amostras e controles foram diluídas após 10 movimentos de aspirar e ejetar com o micropipetador multicanal, transferidas para a placa-teste sensibilizada, sendo cobertas com película de plástico e incubadas a 25 °C durante 60 min (± 5 min). Após a incubação, a placa-teste foi lavada quatro vezes mediante aspiração e adição de aproximadamente 300 µl de solução de lavagem a cada poço, usando-se a lavadora de microplacas modelo aw1 (marca Anthos, Labtec Instruments, Wals, Austria) sendo brevemente secas. Anticorpo anti-anticorpo de bovino conjugado com HRPO (100 µL) foi adicionado a cada poço. Então, a microplaca foi novamente coberta e incubada a 25 °C durante 30 min (± 2 min). Outras quatro lavagens foram realizadas nesta etapa na mesma lavadora. O peróxido como substrato com o cromógeno TMB (100 µL) foi colocado em todos os poços. No momento da utilização, a quantidade de reagente a ser utilizada foi medida em tubos Corning descartáveis (15 ml) e disposta em canaletas de 55 ml de poliestireno descartáveis não-estéreis (modelo HS-YL-JT 20621-B) que permitissem o uso de micropipetas multicanal. O líquido excedente foi eliminado em vez de voltar para a sua embalagem original. A placa foi coberta e incubada a 25 °C durante 15 min (± 1 min). Então, a solução *stop* (100 µL) foi acrescentada a cada poço. A absorbância foi lida a 450 nm em um espectrofotômetro leitor de microplacas (SpectraMax M5, Molecular Devices). Os resultados foram calculados (razão S/P) de acordo com as instruções do fabricante em planilhas de cálculo Excel para Windows.

Amostras no abate: Cento e cinquenta e seis animais de 9 dos 21 rebanhos tiveram linfonodos e tecidos de lesões coletados no abate. Entre os linfonodos colhidos, os retrofaríngeos mediais e os mediastínicos foram escolhidos para a cultura de micobactérias e PCR. Tonsilas, linfonodos traqueobronquiais e/ou mesentéricos também foram utilizados. Ao abate, os indivíduos foram classificados como “com presença” de lesão ou lesão “ausente”.

Técnicas diretas: Para confirmar o *status* de rebanho positivo ou negativo, culturas bacterianas para micobactérias foram realizadas a partir de amostras coletadas no abate. As PCR foram utilizadas para confirmar as bactérias isoladas no meio de cultivo, bem como para detectá-las diretamente nas amostras colhidas no abate. As PCRs para culturas utilizam como iniciadores específicos JB21 and JB22 primers system para *M. bovis* e diretamente de tecidos, as PCR em tempo real (q-PCR) para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), complexo *Mycobacterium avium* (MAC), *M. bovis* e *M. tuberculosis* foram realizadas de acordo a Luiz (2011). Para o isolamento de micobactérias (*M. bovis* e *M. avium*), foi utilizada a técnica descrita por Araújo (2004) e Araújo et al. (2005). Brevemente, para o exame bacteriológico, amostras de tecido foram descontaminados pelo método de Petroff (Kantor et al., 1979), cultivados em meio Stonebrink, incubados a 37 °C e semanalmente observados para o crescimento de micobactérias até 120 dias. Esfregaços diretos das colônias suspeitas foram corados

pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) para pesquisa microscópica de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). A identificação das cepas de *M. bovis* e *M. avium* foi realizada através de métodos bioquímicos padrão (amostras de LANAGRO-MG) ou por PCR com iniciadores JB21 e JB22 para o MCT (Rodriguez et al., 1995; Shah et al., 2002). Controles para a especificidade e sensibilidade analítica foram realizados conforme descrito por Araújo et al. (2013). No rebanho Q, positivo pelo TCC, as amostras de linfonodos e tecidos dos bovinos no abatedouro foram colhidas somente após o teste de rebanho anterior ao do TCC e colheita de soro aqui estudados e foram colocadas em formalina para a coloração de Gram, histopatologia e ZN para pesquisa de BAAR.

Análise dos dados: As mesmas amostras de soro foram testadas para a detecção de anticorpos contra *M. bovis* por ambos os testes ELISA. Algumas amostras, cujos resultados foram muito próximos ao ponto-de-corte foram testadas novamente. Os resultados foram confrontados com os obtidos no TCC para a elaboração da curva ROC (*Receiver-Operating Characteristic*) com o *software* MedCalc versão 9.6.4.0 (2), sendo calculadas a sensibilidade (Se), a especificidade (Es), a área sob a curva (AUC), o intervalo de confiança (IC) e o índice “J” de Youden ($J = Se + Es - 1$). Gráficos de caixa (“box-plot”) de rebanho e categoria de rebanhos para os resultados de ELISA e gráficos de dispersão entre os resultados de ELISA foram desenhados (*software* estatístico Minitab 16.1.0.0) antes de que um ponto-de-corte fosse determinado para o ELISA experimental. As tabelas de contingência 2 x 2 de números e proporções foram produzidas por rebanho, por categoria de rebanhos e entre os testes ELISA, sendo neste caso o ELISA comercial a referência para o teste experimental. A prevalência aparente ($Pa = [(a + b) / (a + b + c + d)]$), a prevalência verdadeira ($Pv = [(Pa + Sp - 1) / (Se + Sp - 1)]$), o índice *kappa* de concordância com o IC, o teste qui-quadrado (*McNemar*), a razão de casualidade (*odds ratio*) com os resultados do IC entre cada ELISA e o TCC foram calculados utilizando o programa SAS. Para determinar o estado do rebanho, os resultados dos animais testados individualmente foram considerados de forma agregada (Martin et al., 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antecedentes dos rebanhos: As informações de campo obtidas em relação aos 21 rebanhos amostrados neste artigo foram os intervalos entre a realização dos testes de tuberculinização, o número de resultados negativos, inconclusivos, positivos, o total de bovinos no rebanho na data do teste e o número de bovinos descartados (**Quadro 1**). Com base nos resultados dos testes e dos TCC informados, os rebanhos foram categorizados em 5 grupos: 3 rebanhos como “sem certificação e sem histórico de infecção” (A-C); 3 “certificados livres sem histórico de infecção” (D-F); 3 “certificados livres com histórico de infecção” (G-I); 2 “tuberculina-negativos com histórico de infecção” (J e K); e 10 “tuberculina-positivos com comprovação” (L a U), com exceção do rebanho L, que teve um animal consecutivamente inconclusivo no teste de rebanho do qual as amostras de soro foram colhidas e depois teve animais PCR-positivos. Este matiz de sororreatividade classificaria na variabilidade necessária à avaliação de testes sorológicos, poderia estar relacionado com fases de controle da infecção para cada grupo e permitiria inferir sobre a certeza nos resultados.

Análise exploratória: Os resultados de cada um dos ELISAs foram confrontados com os resultados do TCC, em curvas ROC (**Figura 2**). A área sob a curva indica que as distribuições de frequência dos resultados das populações negativa e positiva, segundo o TCC, se sobrepõem e, assim, quando o teste de referência para os ELISAs é o TCC, a sensibilidade e especificidade são baixas ($J_E = 0,1620$; $J_C = 0,1136$). Ainda assim, os resultados do ELISA experimental ficaram bem próximos do nível de aceitação de 95% ($P = 0,0639$), diferentemente do ELISA comercial ($P = 0,2975$).

ELISAs por rebanho: Os resultados de cada ELISA por rebanho foram dispostos em gráficos de caixas (**Figura 3**). A dispersão maior nos resultados do ELISA experimental em todos os rebanhos é provavelmente devida à forma de padronização do teste e aos sistemas de revelação e parada diferente entre os testes. No caso do ELISA experimental, a grande maioria dos rebanhos teve os resultados acima de um possível ponto-de-corte que permitisse isolar como negativo um conjunto de rebanhos. Entretanto, com um ponto-de-corte próximo de 0,300, existe um rebanho (J) completamente negativo para o ELISA experimental, que se diferencia dos demais (**Quadro 1**). Os pontos desfavoráveis em relação a esse rebanho foram o fato de ter tido casos de tuberculina-positivos (**Quadro 1**) e a quantidade de 19 amostras de soro desse rebanho, que tinha ao todo aproximadamente 50 animais. O ELISA comercial também foi negativo nesse grupo de amostras. Para subir o ponto-de-corte do ELISA experimental, os próximos rebanhos a ser incluídos como negativos seriam os rebanhos G e M. No rebanho M, já se sabia existirem bovinos positivos naquele mesmo teste no TCC, lesões ao abate e confirmação por cultura e PCR. O rebanho G, por sua vez, era certificado livre, com histórico de infecção. Neste, as vacas com razão S/P mais altas faziam parte de um grupo de novilhas prenhas importadas, que foram TCC positivas anteriormente (**Tabela 1**, rebanho 14, testes 1 e 2).

Contudo, com o ponto-de-corte do ELISA comercial, definido pelo fabricante na razão S/P de 0,300, quatro rebanhos foram negativos (além do J, já mencionado e do G,

o rebanho A e o Q). O rebanho A, colocado na categoria de “não-certificado e sem histórico de infecção”, há pelo menos dois anos não vinha sendo tuberculinizado e, de certa forma, o seu resultado negativo surpreendeu, pois se nele houvesse infecção, teria havido tempo para transmissão. O rebanho Q também foi positivo segundo o TCC e nos dois testes de rebanho poucos meses antes, um lote de 31 vacas foi confirmado por meio da inspeção e da histopatologia (Vidal et al., prelo).

Dispersão dos resultados: Os resultados de ELISAs numa escala contínua (neste caso, a razão S/P) permitem saber quão positivo ou negativo é o resultado de cada amostra, ao invés de aplicar imediatamente um ponto-de-corte e reduzi-los à escala binomial. Assim, além de curvas ROC por teste e por rebanho TCC positivo, e de gráficos de caixa (“box-plot”) por rebanho e por categoria de rebanhos, foram desenhados também gráficos de dispersão em pontos entre os ELISAs, para elucidar a situação dos resultados nos diferentes rebanhos. Ensaiaando-se o ponto-de-corte para o ELISA-experimental na categoria de rebanhos “não certificado, sem histórico de infecção” (A a C), ele poderia estar um pouco abaixo de 0,300 para incluir um indivíduo do rebanho A, que parece pertencer ao grupo positivo, enquanto no rebanho B, o ponto-de-corte parece sobrepassar o grupo de amostras de resultado negativo. Não obstante, nesse rebanho B, para o ELISA comercial, há resultados que ficaram próximos do ponto-de-corte, mostrando que cada um dos testes identifica como positivos (ou próximos dos positivos) indivíduos diferentes (**Figura 5 A a C**). Além do mais, o fabricante do teste comercial destaca que, conforme a situação epidemiológica do rebanho e segundo o interesse do criador, o ponto-de-corte, definido na razão S/P 0,300, pode ser movimentado tanto mais para cima, quanto para baixo. Sem o gráfico de dispersão, portanto reduzindo-se os resultados a negativos ou positivos, na distribuição binomial, para tabelas de contingência, somente se obtêm os dados contados de cada quadrante dos gráficos de dispersão, para as concordâncias ou discordâncias entre os testes. Já os rebanhos certificados livres (**Figuras 5D a F e G a I**), surpreendentemente, têm mais indivíduos positivos no ELISA comercial, do que categorias menos testadas e não-certificadas, exceto o rebanho G, totalmente negativo, mas que segundo os testes cervicais comparativos, é um rebanho com histórico de infecção. No rebanho G, deve-se notar que um grupo de 7 animais se aproxima do ponto-de-corte do ELISA comercial (**Figura 5 G a I**). A categoria de rebanhos “TCC-negativos sem histórico de infecção” (rebanhos J e K) (**Figura 5 K e J**) têm em comum com a categoria anterior os rebanhos A e J, sem nenhum indivíduo positivo segundo o ELISA comercial. Porém todos os rebanhos destas duas categorias têm em comum o fato de que o ELISA experimental está considerando infectados em cada rebanho alguns indivíduos, contudo nunca atingindo razões S/P acima de 0,6 a 0,7. A grande maioria dos indivíduos de ambas as categorias é de negativos, com dois dos 5 rebanhos negativos ao ELISA comercial.

Ponto-de-corte aplicado: Porém, com a razão S/P de 0,300 como ponto-de-corte para ambos ELISAs, experimental e comercial, não existe nenhum rebanho completamente positivo em qualquer dos ELISAs, que facilite a separação física completa em grupos de indivíduos positivos para sensibilidade de 100% e uma abordagem por meio de análise

discriminante, sem outra transformação dos dados, com matemática laboriosa e complexa.

Prevalência de rebanho: Utilizando-se, o ponto-de-corte arbitrário de 0,300 para o teste experimental, o mesmo do ELISA comercial, e considerando-se infectado o rebanho que tivesse ao menos um indivíduo positivo a qualquer dos testes, a prevalência de rebanho segundo o ELISA experimental, ELISA comercial e TCC foi de 20/21, 17/21 e 9/21, respectivamente. Apenas o rebanho J teve todos os animais negativos a ambos os testes ELISA, enquanto quatro rebanhos foram negativos segundo o ELISA comercial (A, G, J e Q). As prevalências individuais aparentes (P_a) e verdadeira, foram calculadas (**Quadro 2**). Um achado importante, entretanto, foi o fato de que os resultados dos ELISAs experimental e comercial foram soropositivos nos rebanhos certificados livres de tuberculose (6/6 e 5/6 rebanhos, respectivamente).

Tabelas de contingência: Os testes ELISA detectaram quantidades diferentes de soropositivos. A discordância dos ELISAs experimental e comercial em relação ao TCC e dos ELISAs produziu índices *kappa* de concordância baixos (4,6; - 2,16%, respectivamente) (**Quadro 2**). Também as sensibilidades dos ELISAs experimental e comercial em relação ao TCC foram baixas (28,8 e 9,3%, respectivamente), e a especificidade de 82,6 e 86,4%, respectivamente, variando muito dentro de cada categoria (dados não apresentados). Pôde-se observar que nos rebanhos das categorias negativas para tuberculose segundo o TCC, a especificidade foi mais alta no ELISA comercial, ocorrendo o inverso nos rebanhos positivos. A concordância *kappa* nas análises foi mínima (**Tabela 2 B**). Tomando-se como referência o teste ELISA comercial, os resultados de sensibilidade e especificidade do ELISA experimental foram 30,3 e 84,0%, respectivamente (**Tabela 2 III**). Nestas condições, também foi determinada a ausência de concordância *kappa* tanto em âmbito geral como de cada categoria.

Se for considerado o valor percentual de resultados positivos apenas em cada um dos ELISAs, houve maior frequência em ambos os testes nos rebanhos certificados livres, ao mesmo tempo em que esta frequência é normalmente mais alta no ELISA comercial nos rebanhos negativos e ocorre o inverso nos rebanhos positivos (**Figura 4**).

Sensibilização pela tuberculina: A partir da alta de soropositividade dos rebanhos certificados livres de tuberculose ao ELISA comercial (rebanhos de D a I), mas também segundo o ELISA experimental, que considerou 6 dos 6 rebanhos infectados, hipotetizou-se que a reatividade aos ELISAs pudesse, ao menos nestes rebanhos certificados livres, ser resultado de sensibilização por tuberculina. Nos rebanhos infectados, a sensibilização seria possível, pois alguns deles estavam sob repetidas tuberculinizações. Entretanto, nos rebanhos certificados livres, a última tuberculinização tinha sido aplicada entre 5 meses e meio e 11 meses e meio antes da colheita de soro. As colheitas de soro dos rebanhos D a H foram feitas no momento da leitura do TCC, porém não no rebanho I, com 24,26 e 62,13% de soropositividade nos ELISAs experimental e comercial, respectivamente. Esse rebanho foi tuberculinizado anualmente e, somente dois anos antes, 3 vezes no ano, para a certificação (**Quadro 1**),

porém tinha histórico de infecção. Mesmo que houvesse algum efeito dessa sensibilização, ela não aconteceria nessa intensidade sem a presença de infecção.

No caso do rebanho Q, positivo ao ELISA experimental e negativo ao comercial, onde as tuberculinizações vinham sendo frequentes (**Quadro 1**), assim como nos rebanhos R, S e U, os mais fortemente positivos segundo o ELISA experimental, mas também positivos no comercial, a presença de infecção faria com que a soropositividade à infecções se confundisse com esse efeito da sensibilização. Os intervalos de TCC vinham sendo entre 76 e 186 dias. Rebanhos como o A e M, que não foram tuberculinizados recentemente, eram negativos, especialmente ao ELISA comercial e davam suporte à hipótese da sensibilização. O rebanho G, foi tuberculinizado aproximadamente 8 meses e meio antes, mas tinha histórico de infecção e também teve animais soropositivos somente pelo ELISA experimental. Ocorre que as vacas TCC-positivas foram retiradas do rebanho e, somente então, o teste ELISA foi realizado (**Quadro 1**). Então, ao menos 3 fatores podem estar interferindo diretamente na sororeatividade: além da presença de infecção, as tuberculinizações frequentes e a retirada das vacas tuberculina-positivas e provavelmente infectadas.

Essa porcentagem alta de animais reagentes-positivos nos rebanhos certificados livres nos dois ELISAs poderia dever-se ao fato de que TCCs consecutivos aumentariam a resposta humoral de bovinos positivos, tornando-os soropositivos (Harboe et al., 1990). Entretanto, isto não foi evidenciado nos resultados deste trabalho. Blanco et al. (2009) demonstraram uma expansão da resposta mediada por linfócitos Th1 e Th2 após estimulação com PPD em bovinos reagentes à tuberculina. Quevillon et al. (2013) incluindo bovinos negativos, confirmaram a diferença e hipotetizaram que populações CD8⁺ e linfócitos B poderão servir de biomarcadores de diferentes fases da infecção.

Grupo de abatidos: Quando considerados os resultados dos ELISAs dos 151 animais abatidos, tendo como referência animais com lesões (n = 147) e os resultados de culturas confirmadas pela PCR (*primers* JB), os dados foram reunidos em tabelas de contingência para análises de contagem (**Tabela 3**). A sensibilidade e a especificidade dos testes foram semelhantes aos resultados com todas as amostras. Dos animais abatidos e testados sorologicamente, 78 (51,7%) foram negativos no TCC, sendo que 14 (17,9%) e 11 (14,1%) deles apresentaram resultados positivos nos ELISA experimental e comercial, respectivamente. No entanto, em apenas 1/11 (9,1%) e 3/14 (21,4%) deles foi confirmada a presença de *M. bovis* mediante PCR da cultura e/ou PCR de linfonodo (predominantemente, o retrofaríngeo). Por outro lado, dos 73 (48,3%) animais TCC-positivos, 21 (28,8%) e 5 (6,8%) foram negativos nos ELISAs experimental e comercial, respectivamente. Não obstante, 31/52 (59,6%) e 57/68 (83,8%) animais foram confirmados por PCR. Estes resultados indicam maior sensibilidade/especificidade do ELISA experimental quando comparado ao comercial. Todos os animais testados por PCRs, tanto para o complexo *Mycobacterium avium* quanto o específico para *Mycobacterium tuberculosis*, tiveram resultado negativo. A repetição dos resultados dos testes ELISA, tanto o experimental quanto o comercial,

demonstrou boa repetibilidade dos testes, confirmando os resultados obtidos na escala da razão S/P (dados não mostrados).

Para permitir conhecer os resultados dos testes diretos realizados sobre as amostras colhidas dos animais abatidos, os mesmos índices foram calculados para o cruzamento das frequências dos resultados (concordâncias e discordâncias) (**Tabela 4**) entre cultura confirmada por PCR (JB) e / ou q-PCR diretamente de linfonodos ou tecidos (VIII), TCC ou cultura versus *M. bovis* (IX), confirmações de cultura por PRC com JB (X) e *M. bovis* versus PCR para o complexo *M. tuberculosis* (XI). As prevalências ficam artificialmente altas e as inferências aqui devem ser tomadas com cautela.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi procurada uma amostragem da realidade local, que representasse tanto a variabilidade, quanto grupos de indivíduos, desde negativos até os que pudessem estar realmente infectados e doentes. Assim, foram testados rebanhos naturalmente infectados, dos quais não se conhecia a prevalência de infecção por *M. bovis*, nem de lesões causadas pela bactéria. Também, foram incluídos rebanhos certificados livres de tuberculose bovina. Ressalta-se o fato de que os rebanhos constituíam grupos isolados, uma vez que, ao menos entre eles, não há histórico de intercâmbio de animais. Desta maneira, os testes de ELISA foram utilizados em condições de uso real sem a interferência de seleções prévias de indivíduos nem de rebanhos sabidamente infectados por *Mycobacterium bovis*. Duas limitações para aferir a qualidade dos testes (acurácia e confiabilidade) se impõem: a inexistência de um teste-padrão de referência (“gold-standard”) e o antagonismo entre a resposta celular e humoral nas diversas fases da tuberculose bovina, que desqualificariam o TCC como balizador, ao menos individual, dos resultados dos ELISAs para anticorpos. Entretanto, o TCC, ainda que não tenha excelente sensibilidade, é um teste específico. Não utilizá-lo seria uma falha.

O TCC vem sendo amplamente utilizado para avaliar o desempenho dos testes ELISA para a tuberculose bovina (Harboe et al. 1990; Waters et al. 2011; Medeiros et al. 2010; Souza et al. 2012). No entanto a inversão observada entre as respostas celular e humoral, nas diversas fases da tuberculose bovina (Ritacco et al., 1991; Welsh et al., 2005), limitam o uso do TCC como referência para os testes sorológicos. As diferenças observadas entre os testes ELISA e o TCC fundamentam-se nas distintas respostas imunológicas detectadas por cada um dos testes. Enquanto estes ELISAs indiretos detectam resposta humoral, no TCC se evidencia a celular. Portanto, a divergência já provada por outros autores foi aqui demonstrada.

Já as divergências observadas entre os dois testes ELISA podem estar associadas às diferenças entre os antígenos utilizados em cada um dos testes. No ELISA experimental, as placas estão sensibilizadas com uma quimera formada por fragmentos hidrofílicos de três proteínas: MPB-70, MPB-83 e ESAT-6 (Souza et al., 2012); enquanto no ELISA comercial, os antígenos são somente duas proteínas: MPB-70 e MPB-83 (Waters et al., 2011). O maior número de rebanhos e animais detectados pelo ELISA experimental, na categoria dos rebanhos positivos, pode ser justificado pela cinética de

resposta humoral aos diferentes antígenos do *M. bovis*, que varia com a evolução da infecção. Os anticorpos anti-MPB-83 e anti-ESAT-6 são mais precoces, por isto podem ser detectados a partir das quatro e 12 semanas pós-infecção, respectivamente (Waters et al. 2006; Lyashchenko et al. 1998), enquanto os anticorpos anti-MPB70 geralmente são detectados entre as 18 e 22 semanas depois da infecção experimental (Harboe et al. 1990; Fifis et al. 1992). Com isso, a presença de fragmentos da proteína ESAT-6 na quimera do ELISA experimental pode ter permitido incluir animais com infecção recente, uma vez que nos rebanhos positivos há risco maior de novas infecções, o que não ocorreria nos rebanhos negativos.

As frequências mais altas de positividade do ELISA experimental nos rebanhos TCC-positivos, e do ELISA comercial nos rebanhos TCC-negativos poderiam ter ocorrido porque o teste experimental discriminaria melhor infecções ativas, produzidas devido à presença de animais anérgicos ou “não-responsivos”, enquanto o ELISA comercial detectaria infecção inicial, mas já não detectadas pelo TCC. As proporções diferentes de antígenos e epítomos nos testes são também prováveis explicações para as diferenças entre os ELISAs experimental e comercial, que detectam com intensidades diferentes a positividade de resultados de alguns rebanhos ou as deixam de detectar. No caso da quimera do ELISA experimental, a estrutura secundária poderia interferir negativamente. Entretanto, o teste experimental pode ter tido em seu favor o fato de ter incluído amostras destes mesmos rebanhos na sua padronização, o que não foi o caso do ELISA comercial. A diferença entre os testes, contudo, bem além dos percentuais de indivíduos detectados, detectou efetivamente populações diferentes (**Figura 5**). A MPB-70 é uma proteína secretada, cujos anticorpos específicos poderiam estar presentes, porém ligados e quelados (“ocupados”) pelo antígeno na resposta, de forma que não seriam detectados em algumas fases da infecção. No caso da quimera, a proporção de fragmentos de cada um dos três antígenos utilizados foi a mesma e a padronização do teste pode favorecer amostras de uma fase da infecção, mas não todas as fases ou algumas fases específicas e/ou essenciais da doença. No trabalho de Souza et al. (2012), não foi testado cada fragmento como sensibilizante único de placas, apenas as proteínas completas e não foram testados os fragmentos isoladamente nem a própria quimera com amostras mais específicas de soro, que poderiam ser, por exemplo, soros policlonais anti-MPB-70, anti-MPB-83 e anti-ESAT-6.

Nos artigos referentes ao desenvolvimento e padronização dos ELISAs utilizados neste estudo, sensibilidades e especificidades foram mais elevadas do que as obtidas aqui: 83,2% e 86,5% (Souza et al., 2012); e, 63% e 98% (Waters et al., 2011), respectivamente. Esta diferença pode ser um reflexo dos rebanhos e dos indivíduos utilizados, que foram selecionados com base a resultados de tuberculinização para a padronização da técnica, enquanto neste trabalho estão todos os indivíduos expostos ou não à “ocorrência natural” da bactéria. A variabilidade na sororeatividade dos 21 rebanhos é relacionada a fases e/ou controle da infecção em cada grupo e antígenos utilizados nos testes sorológicos (Harboe et al. 1990; Wiker et 2009; Waters et al. 2006).

Outra ressalva importante é que em caso de prevalências muito baixas ou de valor zero nos TCC, mesmo com a metodologia de curvas ROC, os valores de acurácia e concordância dispostos em tabelas de contingência ficam prejudicados. Neste trabalho, apesar de terem sido utilizados rebanhos francamente infectados, os animais com resultado TCC-positivo foram 118, distribuídos em 8 dos 21 rebanhos. Mesmo assim, nos rebanhos H e L, nos quais foram detectados anticorpos nos ELISAs e confirmados por cultura e/ou PCR, sem presença de lesão e com TCC negativos, os animais infectados pareciam de fato estar dissimulados, da forma descrita pelos autores que sugerem o uso dos ELISAs (Buddle et al., 2009; de la Rúa-Domenech, et al., 2006; Whelan et al. 2011). Somada a isto, a utilização de testes sorológicos para detecção de bovinos tuberculose-positivos, além de depender da prevalência do rebanho, pode sofrer interferência de fatores ambientais e do hospedeiro, tais como exposição a outras micobactérias, estresse, nutrição, parasitismo e presença concomitante de outras enfermidades (Schiller et al., 2010).

A sensibilidade da PCR para o complexo *Mycobacterium avium* (CMA) foi testada de forma analítica, contra culturas de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) e não foi aplicada como exame de linfonodos do sistema respiratório em bovinos que se soubessem estar infectado com MAP. Por isto, para este objetivo, não se pode inferir com segurança, excluindo a presença de infecção. Não obstante, a paratuberculose no Brasil ainda é considerada uma doença de baixa prevalência nos rebanhos leiteiros comerciais (Yamasaki et al., 2013). As prevalências calculadas na maioria dos casos são resultados obtidos de rebanhos sabidamente infectados. Ademais, a leitura de resultados das reações à tuberculina aviária especialmente dos rebanhos H e I, certificados livres com histórico de infecção por *M. bovis*, nas que tiveram alta positividade nos ELISAs, especialmente no ELISA comercial, indicaram poucos animais com reações maiores do que 2,0 mm e menos de maiores do que 4,0 mm. A ausência de PCR-CMA positivas em linfonodos do pulmão e retrofaríngeos indica que infecção por bactérias do grupo MAC estariam ausentes ao menos no sistema respiratório. Esta prova teria que ser testada em animais infectados por MAP e amostras dirigidas à detecção de MAP não foram colhidas. Também, os animais não foram examinados no tocante à paratuberculose nestes 21 rebanhos estudados.

A análise estatística realizada com base nas frequências (“frequentista”) desfavorece estudos que tenham que levar em conta o conjunto de variáveis históricas, que nos obrigaram à descrição comparada da primeira parte dos resultados. O ponto-de-corte do teste passa a determinar todas as demais consequências, tanto daquilo que o teste pode detectar, quanto da confiabilidade que se pode esperar sobre os resultados do teste. Além disto, a abordagem frequentista, ou seja, de dados de contagem, notadamente desfavoreceu os resultados, se o observador espera que um teste faça o mesmo que os demais testes e não cumpra um papel complementar na detecção de outros indivíduos infectados. O fato de que os animais não foram representados de forma proporcional no abate em relação ao total de animais testados e que os testes utilizados como confirmatórios também são testes imperfeitos, especialmente do ponto-de-vista da sensibilidade, que depende, por exemplo, da

presença do agente etiológico viável ou partes dele naquele linfonodo, no momento do abate, também impede a análise linear e simplificada, inclusive a extração de índices de sensibilidade e especificidade de forma objetiva. Quando eles não foram apresentados, foi porque os autores entenderam que os vícios inerentes a eles serviriam mais para enganar, do que para dar suporte a conclusões seguras. Como exemplo, entre os rebanhos certificados livres somente um dos rebanhos foi efetivamente confirmado por testes diretos, o que não significa que os testes ELISA estavam equivocados nos demais resultados deste grupo, porque somente um grupo de 5 bovinos TCC-negativos de outro rebanho livre foi enviado ao abate e eles não eram todos ELISA-positivos, que pudessem auxiliar na confirmação dos resultados positivos.

Os resultados obtidos demonstraram a necessidade da utilização de um teste complementar além do TCC para a identificação de animais reativos à tuberculose bovina. Porém, a baixa concordância dos testes com os resultados obtidos a partir dos bovinos abatidos, especialmente para aqueles cujo resultado era confirmatório (cultura confirmada pela PCR com *primers* JB e q-PCR diretamente de tecidos), mas também quando se considera que o TCC tem alta especificidade, desqualifica os ELISAs aqui estudados, tanto para uso isoladamente em diagnóstico em rebanhos das mesmas condições epidemiológicas, quanto para determinação de prevalência em inquérito soropidemiológico. Entretanto, com o objetivo de erradicação da tuberculose bovina em ações de controle, os animais com infecção ativa não detectados pelo TCC seriam, segundo os resultados aqui apresentados, mais diagnosticados por meio do ELISA experimental. Assim, como os ELISAs não coincidem em detectar animais comprovadamente infectados e sem eles os rebanhos ainda infectados, onde a resposta celular desaparece, deixam de ser detectados, é que se propõe que a sua qualidade necessita ser melhorada para permitir o seu uso em conjunto com outros testes.

CONCLUSÃO

A concordância dos ELISAs com o TCC, e mesmo entre os ELISAs, foi mínima. Os testes de tuberculinização quando utilizados como referência deram baixa acurácia aos testes de anticorpos. Poucos rebanhos puderam ser considerados negativos para servir de referência para se inferir sobre a especificidade dos ELISAs. Enquanto o ELISA experimental detectou mais bovinos reagentes-positivos entre os rebanhos confirmados positivos, o ELISA comercial detectou mais bovinos reagentes-positivos entre os rebanhos certificados livres. Foi possível visualizar valores de pontos-de-corte para ambos os testes nos gráficos de dispersão de pontos.

A erradicação da tuberculose e mesmo a certificação a partir de rebanhos livres dificilmente ocorrerá utilizando-se só testes de tuberculinização. A exclusão de bovinos infectados demandará também a detecção de anticorpos, por meio de testes com alta sensibilidade.

BIBLIOGRAFIA

- Amanfu W. 2006. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberculosis*, 86:330-335.
- Araújo, C.P. et al. 2005. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 100(7):749-52.
- Araújo, C.P. et al. 2013. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues by nested-PCR. *Braz J Microbiol.*, Decision on Manuscript ID BJM-2012-0315. (no prelo).
- Araújo, C.P. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação pela reação em cadeia da polimerase. Campo Grande, MS, 2004. UFMS (Dissertação Mestrado), 57 p.
- Blanco F. C. et al. 2009. Study of the immunological profile towards *Mycobacterium bovis* antigens in naturally infected cattle. *Microbiol Immunol.*, 53(8):460-7.
- Brasil. 1994. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria-SDA nº. 64, de 18 de março de 1994. Normas de produção, controle e emprego de tuberculina. *Diário Oficial da União, Brasília (DF), seção 1:4198 (23/03).*
- Brasil. 2004. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa-SDA nº. 6, de 18 de janeiro de 2004. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União, Brasília (DF), n. 7, seção 1:6-10, (12/01).*
- Buddle B.M., Livingstone P.G., de Lisle G.W. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N Z Vet J.*, 57(4):173-80.
- de la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.*, 81(2):190-210.
- Etter E. et al. 2006. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. *Annales of the New York Academy of Sciences*, 1081:61-73.
- Fifis T., Costopoulos C., Corner L.A. & Wood P.R. 1992. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet Microbiol.*, 30:343-54.
- Garnier T. et al. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(13):7877-82.
- Greiner M. & Gardner I. A. 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev Vet Med.*, 45:3-22.
- Harboe M., Wiker H.G., Duncan J.R., Garcia M.M., Dukes T.W., Brooks B.W., Turcotte C. & Nagai S. 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB-70 antibodies in bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol.*, 28:913-21.
- Kantor, I.N. et al. 1979. Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal. p. 63. In: Centro Panamericano de Zoonosis (ed.), Nota técnica 11. OPAS/OMS, Buenos Aires.

- Luiz H. L. 2011. Real time PCR based on Sybr green for detection and differentiation of *Mycobacterium* spp. Campo Grande: FAMEZ-PPGCA, UFMS. Dissertation (MSc). 99 p.
- Lyashchenko K.P., Pollock J.M., Colangeli R., Gennaro M.L. 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 66:5344-9.
- Martin, S. W.; Shoukri, M.; Thorburn, M. A. 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Prev Vet Med*, 14(1-2):33-43.v. 14, n. 1-2, p. 33-43.
- Marvulo M.F.V. et al. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado do Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61(supl.1):93-102.
- Monaghan M.L., Doherty M.L., Collins J.D., Kazda J.F. & Quinn P.J. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40(1/2):111-24.
- Medeiros L., Marassi C.D., Figueiredo E. & Lilenbaum W. 2010. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis. *Braz. J. Microbiol.* 41(3):531-41.
- Mosaad A.A. et al. 2012. Sensitive and specific diagnostic assay for detection of tuberculosis in cattle. *Global Veterinaria* 8(6):555-564.
- OIE. 2012a. IDEXX M. bovis antibody test kit®. In: Procedure for registration of diagnostic kit, n. 20120107. 4 p.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/OIE_Register_MBAT_Abstract_v1_06.2012.pdf Accessed: July 25, 2012.
- OIE. 2012b. Resolution, 24. Register of diagnostic tests validated and accredited by the OIE. 1 p.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/E_OIE_GS_2012_Resolution_n_24.pdf Accessed: July 25, 2012.
- Pollock J.M. & Andersen, P. 1996. ESAT-6 as a diagnostic reagent with increased specificity for bovine tuberculosis. *Immunology*, 89:Oy225.
- Quevillon E.-L. et al. 2013. Comparison of immune peripheral blood cells in tuberculin reactor cattle that are seropositive or seronegative for *Mycobacterium bovis* antigens. *Vet Immunol Immunopathol*, 153(3-4):194-201.
- Ramanakumar A.V. et al. 2011. Use of the normalized absorbance ratio as an internal standardization approach to minimize measurement error in enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human papillomavirus infection. *J Clin Microbiol.*, 48(3):791-6.
- Ritacco V. et al. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.*, 50:365-7.
- Rodriguez J.G., Mejia G.A., Del Portillo P., Patarroyo M.E. & Murillo L.A. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiol.*, 141(Pt 9):2131-8.
- Schiller I., et al. 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.* 57:205-220.

- Shah D.H., Verma R., Bakshi, C.S. & Singh, R.K. 2002. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett., 214:39-43.
- Souza I.I.F., Melo E.S., Ramos C.A., Farias T.A., Osório A.L., Jorge K.S., Vidal C.E.S., Silva A.S., Silva M.R., Pellegrin A.O. & Araújo F.R. 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. Springerplus. 1(1):77.
- Stewart L.D., McNair J., McCallan L., Gordon A. & Grant I. R. 2013. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. PLOS ONE, 8(3):e58374. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0058374>
- Strain S.A.J. & McNair J. 2011. Bovine tuberculosis: a review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle. Agri-food and Bioscience Institute. 45 p. <http://www.dardni.gov.uk/de/afbi-literature-review-tb-review-diagnostic-tests-cattle.pdf>
- Vidal C.E.S. et al. False-negative results in comparative tuberculin test defined by the slaughterhouse inspection and histopathology findings. (prelo)
- Vordermeier H.M. et al. 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. Clin. Vaccine Immunol., 8(3):571-8.
- Waters W.R. et al. 2006. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Clin. Vaccine Immunol., 13(6):648-54.
- Waters W.R. et al. 2011. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. Clin. Vaccine Immunol., 18(11):1882-8.
- Welsh M.D. et al. 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Immunol., 114:101-11.
- Whelan C. et al. 2011. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test. J Vet Diagn Invest., 23(3):499-503.
- Wiker H.G. 2009. MPB70 and MPB83 - major antigens of *Mycobacterium bovis*. Scand J Immunol., 69(6):492-9.
- Yamasaki E.M., Brito M.F., Mota R.A., McIntosh D. & Tokarnia C.H. 2013. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira 33(2):127-140.

Quadro 1 – Intervalos entre testes e número de animais diagnosticados em cada rebanho

Rebanho	Bovinos (n)	Teste nº.	Intervalo entre testes (dias)	Positivos / testes (n)	Inconclusivos (n)	Descartados (n)	Prevalência aparente (%)	Bovinos com lesão / abatidos	<i>M. bovis</i> (n)		Tecido q-PCR (n)		ELISA (% +)	
									Cultura +	JB +	Complex Tb	<i>M. bovis</i>	Experim.	Comerc.
A	110	1	-	0/110	0	0	0	-	-	-	-	-	6,4	0
B	130	*1	-	0/125	0	0	0	-	-	-	-	-	5,6	3,2
C	10	1	-	0/5	0	0	0	-	-	-	-	-	8,3	8,3
	15	*2	18	0/12	0	0	0	-	-	-	-	-		
	16	3	139	0/2	0	0	0	-	-	-	-	-		
D	18	4	190	0/8	0	0	0	-	-	-	-	-	3,4	6,2
	250	1	-	0/86	0	0	0	-	-	-	-	-		
	582	2*	243	0/582	0	0	0	-	-	-	-	-		
E	630	1	-	0/628	0	0	0	-	-	-	-	-	17,1	8,6
	733	2	66	0/630	0	0	0	-	-	-	-	-		
	720	3*	202	0/716	0	0	0	-	-	-	-	-		
F	215	1	-	0/209	0	0	0	-	-	-	-	-	16,4	23,0
	220	2	96	0/217	0	0	0	-	-	-	-	-		
	200	3*	164	0/190	0	0	0	-	-	-	-	-		
G	87	1	-	0/87	1	0	0	-	-	-	-	-	11,3	0
	89	2	69	1/1	0	1	100	-	-	-	-	-		
	89	3*	186	0/89	0	0	0	-	-	-	-	-		
H	271	1	-	0/271	0	0	0	-	-	-	-	-	30,7	27,3
	270	2	75	0/268	0	0	0	-	-	-	-	-		
	270	3*	253	0/264	0	0	0	0/10	-	-	1	2		
I	136	1	-	1/136	7	1	7,3	-	-	-	-	-	24,3	62,1
	442	2	72	0/409	0	0	0	-	-	-	-	-		
	475	3	105	0/459	0	0	0	-	-	-	-	-		
	534	4	223	0/507	0	0	0	-	-	-	-	-		
	-	5	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-		
260	*6	355	0/256	0	0	0	0	0/5	-	-	-	-		
J	50	*1	-	0/47	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0
	52	2	606	1/50	1	1	2,0	-	-	-	-	-		
K	85	1	-	0/85	2	0	0	-	-	-	-	-	7,1	22,6
	90	2	64	0/2	0	0	0	-	-	-	-	-		
	93	3*	161	0/79	0	0	0	-	-	-	-	-		
L	76	1	4 anos	1/74	0	1	1,3	-	-	-	-	-	23,0	4,0
	80	2	175	4/77	17	4	5,2	-	-	-	-	-		

	80	*3	101	0/75	3	0	0	0/15	0	0	1	1		
<i>M</i>	220	1	-	2/212	1	3	9,4	2/47	7	2	2	1	2,4	0,5
<i>N</i>	53	1	-	9/52	3	9	17,3	-	-	-	-	-	11,4	2,9
	36	2	199	1/36	0	1	2,8	-	-	-	-	-		
<i>O</i>	324	*1	-	10/323	10	10	2,8	8/10	5	4	5	9	13,7	6,5
	314	2	70	4/10	0	4	40	4/4	1	1	1	1		
<i>P</i>	23	*1	-	3/22	6	3	13,6	-	-	-	-	-	15,8	26,3
	25	2	194	1/20	0	1	5,0	-	-	-	-	-		
<i>Q</i>	82	1	-	0/79	0	0	0	-	-	-	-	-		
	102	2	216	0/96	7	0	0	-	-	-	-	-		
	90	3	466	0/81	0	0	0	-	-	-	-	-		
	105	4	171	0/100	0	0	0	-	-	-	-	-		
	103	5	140	0/102	0	0	0	-	-	-	-	-	33,0	0
	120	6	235	0/119	0	0	0	-	-	-	-	-		
	126	7	311	19/126	7	4	15,1	4/4	-	-	-	-		
	135	8	108	27/129	5	31	20,1	28/31	-	-	-	-		
97	*9	121	3/96	9	10	3,1	-	-	-	-	-			
<i>R</i>	172	1*	-	16/163	0	16	9,8	9/16	9	9	10	6	42,5	2,3
	195	*2	126	19/178	0	19	10,7	13/19	11	10	6	11		
<i>S</i>	23	1	-	3/17	8	3	17,6	-	-	-	-	-		
	15	2	63	5/8	0	5	62,5	-	-	-	-	-		
	25	3	510	10/25	7	10	40	-	-	-	-	-	45,4	27,3
	12	4	67	1/11	0	1	9,1	-	-	-	-	-		
	15	5	77	0/12	0	0	0	-	-	-	-	-		
17	6*	186	3/17	0	3	17,6	2/3	2	2	3	3			
<i>T</i>	210	1	-	57/207	0	20	27,5	-	-	-	-	-		
	180	2	338	37/37	0	37	100	-	-	-	-	-	14,2	6,3
	100	*3	318	13/95	1	14	14,7	8/14	1	DNA	4	0		
<i>U</i>	93	1	-	11/93	26	11	11,8	-	-	-	-	-		
	125	2*	76	22/123	7	21	17,9	-	-	-	-	-		
	106	*3	85	10/106	7	11	9,4	8/10	6		0	0	66,0	23,0
	98	4	111	2/96	0	2	2,1	-	-	-	-	-		
	124	5	145	3/123	3	3	2,4	-	-	-	-	-		
	121	6	111	1/121	2	1	<0,01	1/3	-	-	1	1		

Legenda: Experim. = experimental; Comerc. = comercial; rebanhos *M* e *O* em itálico = rebanhos de corte; Número do teste em negrito = coletado para sorologia; * Asterisco antes e depois = sangue coletado no momento da aplicação ou da leitura do teste tuberculínico, respectivamente; Positivos e inconclusivos referem-se ao teste da tuberculina; *M. bovis* foi confirmado com PCR específico JB1 & JB2; q-PCR diretamente sobre o tecido foi realizada separadamente para *M. bovis*, *M. tuberculosis*, complexo *M. tuberculosis* e complexo *M. avium*

Quadro 2 – Tabelas de contingência 2 x 2 que confrontam resultados do teste cervical comparativo (TCC), ELISAs experimental (I.) e ELISA comercial (II.) e entre os ELISAs (III.): resultados (A.) e proporções (B.), precisão (sensibilidade – Se e especificidade – Es) e confiabilidade (valores preditivos) (C.), prevalência real, qui-quadrado (McNemar), razão de casualidade, concordância geral, concordância *kappa* e intervalos de confiança (IC)

I. A. (n)

experimental	TCC		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	34	450	484
Negativo	84	2135	2219
Total	118	2585	2703

McNemar: 9,99 (P = 0,002) significativo

Razão de casualidade: 1,9 (IC 95% = 1,273 a 2,897)

II. A. (n)

comercial	TCC		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	11	352	363
Negativo	107	2232	2339
Total	118	2584	2702

McNemar: 1,79 (P = 0,180)

Razão de casualidade: 0,6 (IC 95% = 0,347 a 1,225)

III. A. (n)

experimental	comercial		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	110	374	484
Negativo	253	1965	2218
Total	363	2339	2702

McNemar: 43,78 (P = 0,000)

Razão de casualidade: 2,3 (IC 95% = 1,78 a 2,932)

I. B. (%)

experimental	TCC		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	1,3	16,7	18,0
Negativo	3,1	79,0	82,1
Total	4,4	95,6	100

Concordância geral: 80,2

Concordância *kappa*: 4,6 (IC 95% = 1,2 a 8)

II. B. (%)

comercial	TCC		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	0,4	13,0	13,4
Negativo	4,0	82,6	86,6
Total	4,4	95,6	100

Concordância geral: 83,0

Concordância *kappa*: - 2,16 (IC 95% = - 4,89 a 0,57)

III. B. (%)

experimental	comercial		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4,1	13,8	17,9
Negativo	9,4	72,7	82,1
Total	13,4	86,6	100

Concordância geral: 76,8

Concordância *kappa*: 12,5 (IC 95% = 8,21 a 16,88)

I. C. (%)

TCC versus experimental	Valor		Preditivo
	Se	Es	
Positivo	-	-	7,0
Negativo	-	-	96,2
	28,8	82,6	-

Prevalência real: 4,4

II. C. (%)

TCC versus comercial	Valor		Preditivo
	Se	Es	
Positivo	-	-	3,0
Negativo	-	-	95,4
	9,3	86,4	-

Prevalência real: 4,4

III. C. (%)

comercial versus experimental	Valor		Preditivo
	Se	Es	
Positivo			22,7
Negativo			88,6
	30,3	84,0	

Prevalência real: 13,4

Quadro 3 – Tabelas de contingência 2 x 2 entre lesão sugestiva de tuberculose versus ELISAs experimental (IV.) e comercial (V.) e resultados confirmatórios versus ELISAs experimental (VI.) e comercial (VII.): resultados(A.) e proporções (B.), precisão (sensibilidade – Se e especificidade – Es) e confiabilidade (valor preditivo) (C.), concordância geral, índice de concordância *kappa* e prevalência real

IV. A. (n)

experimental	Lesão		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	14	19	33
Negativo	34	80	114
Total	48	99	147

Concordância geral: 63,9

V. A. (n)

comercial	Lesão		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6	9	15
Negativo	39	93	132
Total	45	102	147

Concordância geral: 67,3

VI. A. (n)

experimental	Cultura e/ou PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	10	12	22
Negativo	33	67	100
Total	43	79	122

Concordância geral: 63,1

VII. A. (n)

comercial	Cultura e/ou PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	3	2	5
Negativo	40	77	117
Total	43	79	122

Concordância geral: 65,3

IV. B. (%)

experimental	Lesão		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	9,5	12,9	22,4
Negativo	23,1	54,4	77,5
Total	32,6	67,3	100

Concordância *kappa*: 10,8 (fraca)

V. B. (%)

comercial	Lesão		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4,1	6,1	10,2
Negativo	26,5	63,3	89,8
Total	30,6	69,4	100

Concordância *kappa*: 5,5 (fraca)

VI. B. (%)

experimental	Cultura e/ou PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	8,2	9,8	18,0
Negativo	27,0	54,9	82,0
Total	35,2	64,7	100

Concordância *kappa*: 9,1 (fraca)

VII. B. (%)

comercial	Cultura e/ou PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2,5	1,6	4,10
Negativo	32,8	63,1	95,90
Total	35,2	64,7	100

Concordância *kappa*: 5,6 (fraca)

IV. C. (%)

Lesão versus experimental	Valor preditivo		
	Se	Es	
Positivo	-	-	42,4
Negativo	-	-	70,2
	29,2	80,8	-

Prevalência real: 32,7

V. C. (%)

Lesão versus comercial	Valor Preditivo		
	Se	Es	
Positivo	-	-	40,0
Negativo	-	-	70,4
	13,3	91,2	-

Prevalência real: 30,6

VI. C. (%)

Positivo versus experimental	Valor Preditivo		
	Se	Es	
Positivo	-	-	45,4
Negativo	-	-	67,0
	23,3	84,8	-

Prevalência real: 35,2

VII. C. (%)

Positivo versus comercial	Valor Preditivo		
	Se	Es	
Positivo	-	-	60,0
Negativo	-	-	65,8
	7,0	97,5	-

Prevalência real: 35,2

Quadro 4 – Tabelas de contingência 2 x 2 entre testes confirmatórios de tuberculose bovina: **(VIII.)** Cultura e/ou PCR versus TCC, **(IX.)** TCC, cultura e /ou PCR versus *M. bovis*, **(X.)** TCC, cultura e PCR versus JB **(XI.)** *M. bovis* versus complexo *M. tuberculosis* (CMtb): resultados **(A.)** e proporções **(B.)**, precisão (sensibilidade – Se e especificidade – Es) e confiabilidade (valor preditivo) **(C.)**, concordância geral, índice de concordância *kappa* e prevalência real

VIII. A. (n)

TCC	Cultura e/ou PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	41	33	74
Negativo	5	49	54
Total	46	82	128

Concordância geral: 70,3

IX. A. (n)

<i>M. bovis</i>	TCC, cultura e PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positive	32	3	15
Negative	49	71	132
Total	45	102	147

Concordância geral: 66,4

X. A. (n)

JB	TCC, cultura e PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	28	1	29
Negativo	4	3	7
Total	32	4	36

Concordância geral: 86,1

XI. A. (n)

CMtb	Cultura e/ou PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	23	11	34
Negativo	11	111	122
Total	34	122	156

Concordância geral: 85,9

VIII. B. (%)

TCC	Cultura e/ou PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	32,0	25,8	57,8
Negativo	3,9	38,3	42,2
Total	35,9	64,1	100

Concordância *kappa*: 43,1 (fraca)**IX. B. (%)**

<i>M. bovis</i>	TCC, cultura e PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positive	20,6	1,9	22,6
Negative	31,6	45,8	77,4
Total	52,3	47,7	100

Concordância *kappa*: 34,5 (fraca)**X. B. (%)**

JB	TCC, cultura e PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	77,8	2,8	80,6
Negativo	11,1	8,3	19,44
Total	88,9	11,1	100

Concordância *kappa*: 47,1 (boa)**XI. B. (%)**

CMtb	Cultura e/ou PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positive	14,7	7,0	21,8
Negative	7,1	71,1	78,2
Total	21,8	78,2	100

Concordância *kappa*: 58,6 (boa)**VIII. C. (%)**

Cultura e/ou PCR versus TCC	Valor preditivo		
	Se	Es	
Positivo	-	-	55,4
Negativo	-	-	90,7
	89,1	59,8	

Prevalência real: 35,9

IX. C. (%)

TCC, cultura e PCR x <i>M. bovis</i>	Valor preditivo		
	Se	Es	
Positivo	-	-	91,4
Negativo	-	-	59,2
	39,5	95,9	

Prevalência real: 52,3

X. C. (%)

TCC, cultura e PCR x JB	Valor preditivo		
	Se	Es	
Positivo	-	-	96,5
Negativo	-	-	42,9
	87,5	75,0	

Prevalência real: 88,9

XI. C. (%)

Cultura e/ou PCR x CMtb	Valor preditivo		
	Se	Es	
Positive	-	-	67,6
Negative	-	-	91,0
	67,6	91,0	

Prevalência real: 21,8

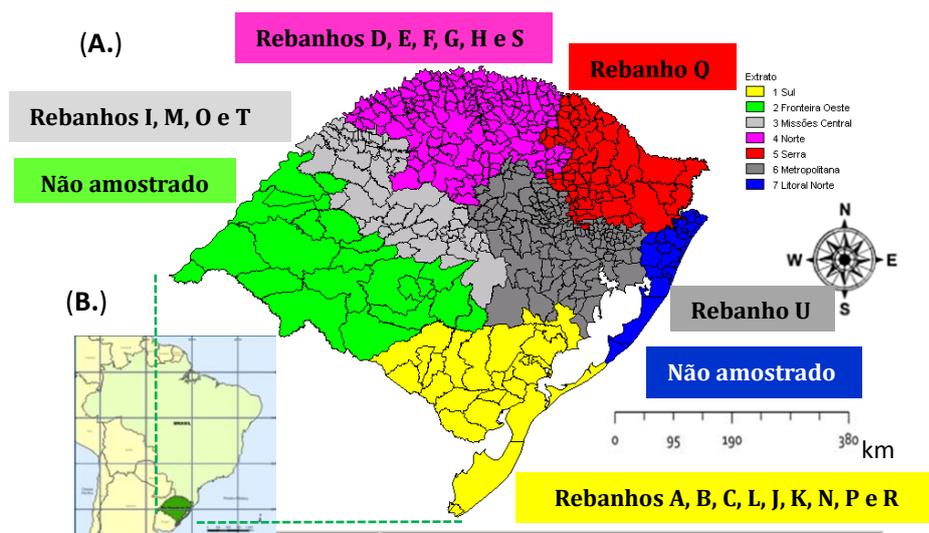
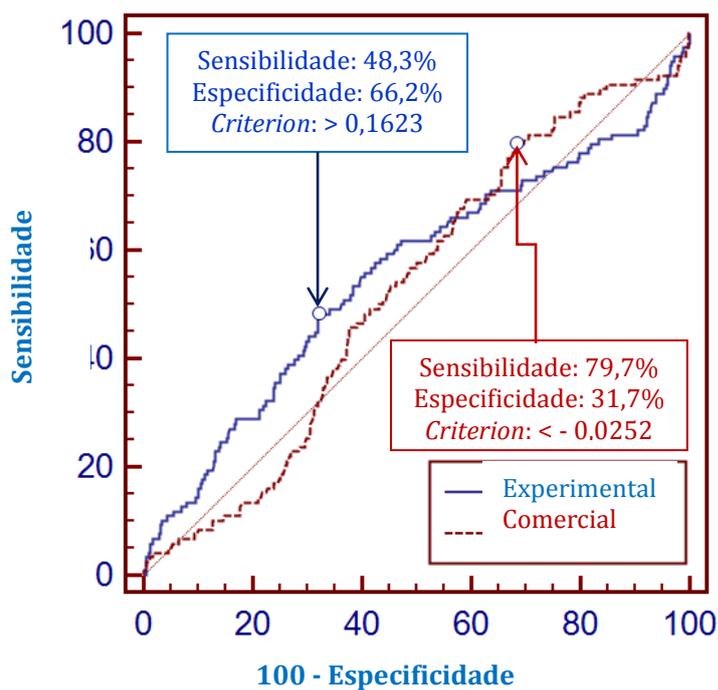


Figura 1 – (A.) Rebanhos amostrados em cada sub-região do Rio Grande do Sul (colorido), classificadas de acordo com os sistemas de produção de gado, características geográficas, econômicas e sociológicas (Marvulo et al., 2009). (B.) Situação do Rio Grande do Sul no território brasileiro



TCC x ELISAs	ELISA experimental	ELISA comercial
Amostragem (n):	2703	2702
Grupo positivo (TCC +):	118	118
Grupo negativo (TCC -):	2585	2584
Área sob a curva ROC (AUC)	0,557	0,526
Intervalo de confiança (95%)	0,538 a 0,576	0,507 a 0,545
Estatística "Z"	1,853	1,042
Nível de significância P (Área = 0,5)	0,0639	0,2975
Índice de Youden ("J")	0,1620	0,1136

Figura 2 – Curvas ROC dos testes ELISA experimental e comercial: áreas sob as curvas ROC (AUC)

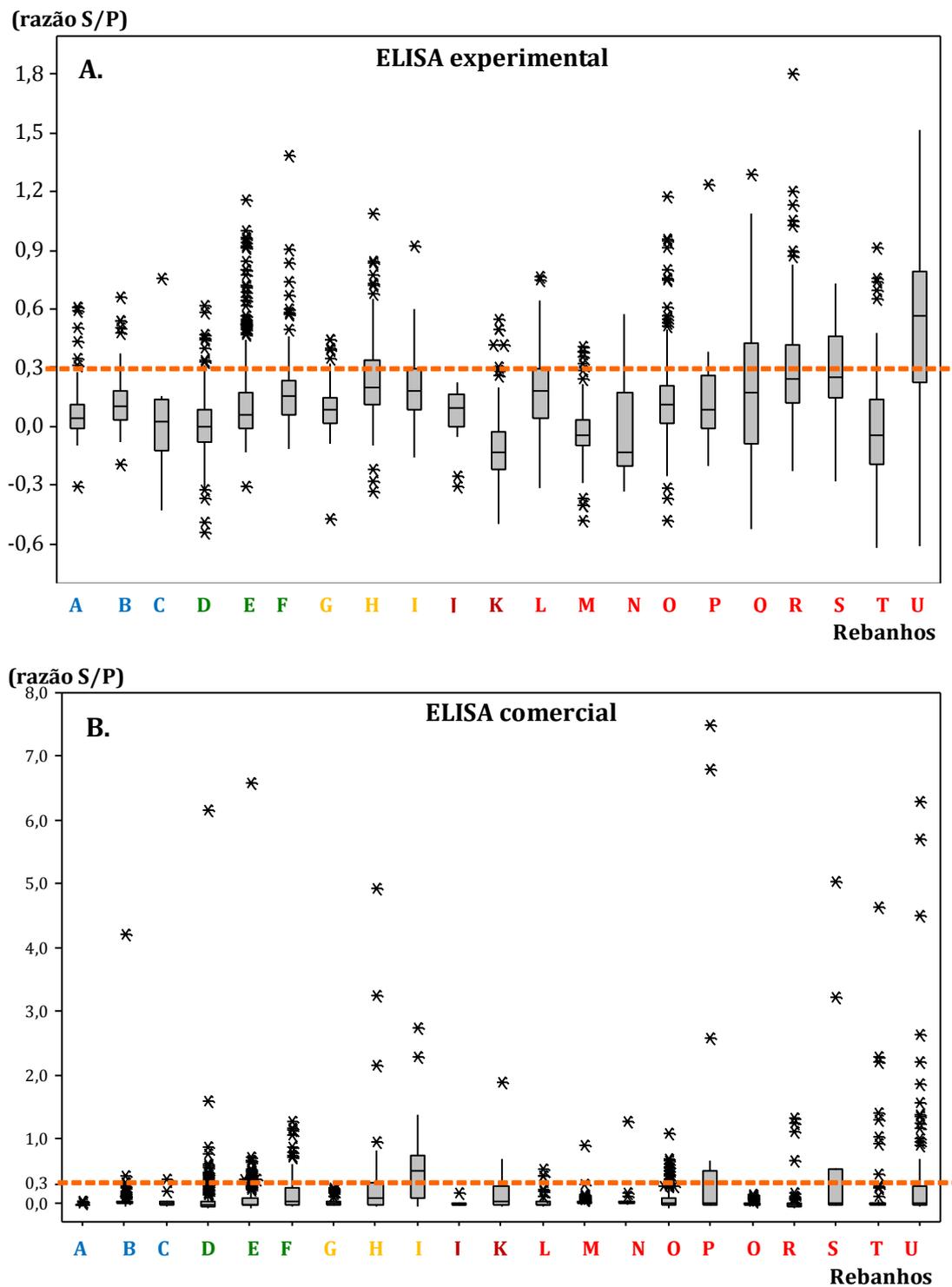


Figura 3 - Resultados de ELISA (razão S/P) por rebanho em gráficos de caixa ("box-plot"): **A.** experimental; **B.** comercial. Pontos-de-corte = 0,300

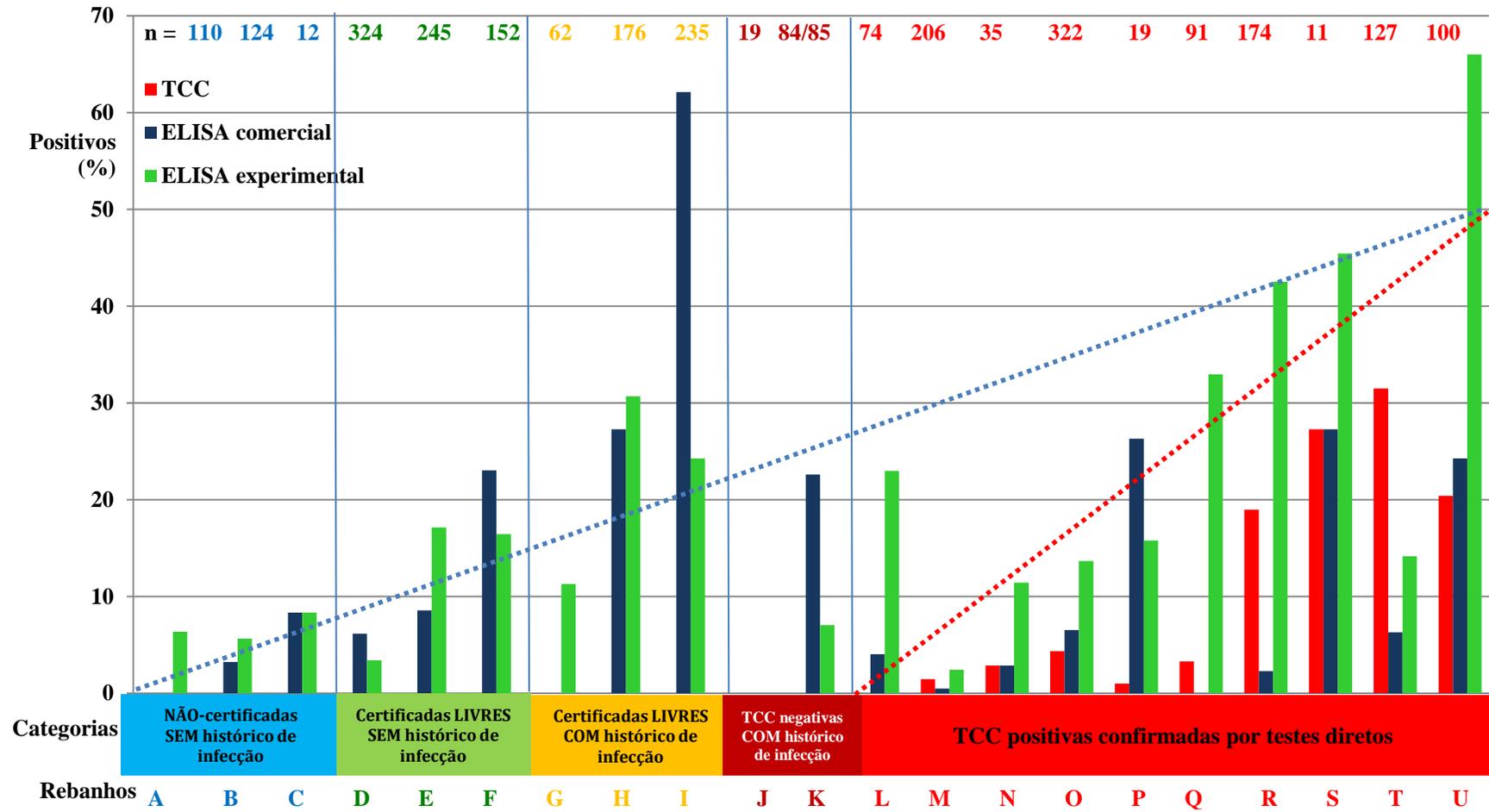


Figura 4 – Resultados positivos (%) nos 21 rebanhos para os três diferentes testes indiretos no teste cervical comparativo (TCC) ■, testes ELISA experimental ■ e comercial ■; número (n) de amostras testadas por rebanho e linhas de tendência dos testes de imunidade humoral (-----) e celular (-----) nas cinco categorias em que os rebanhos foram agrupados

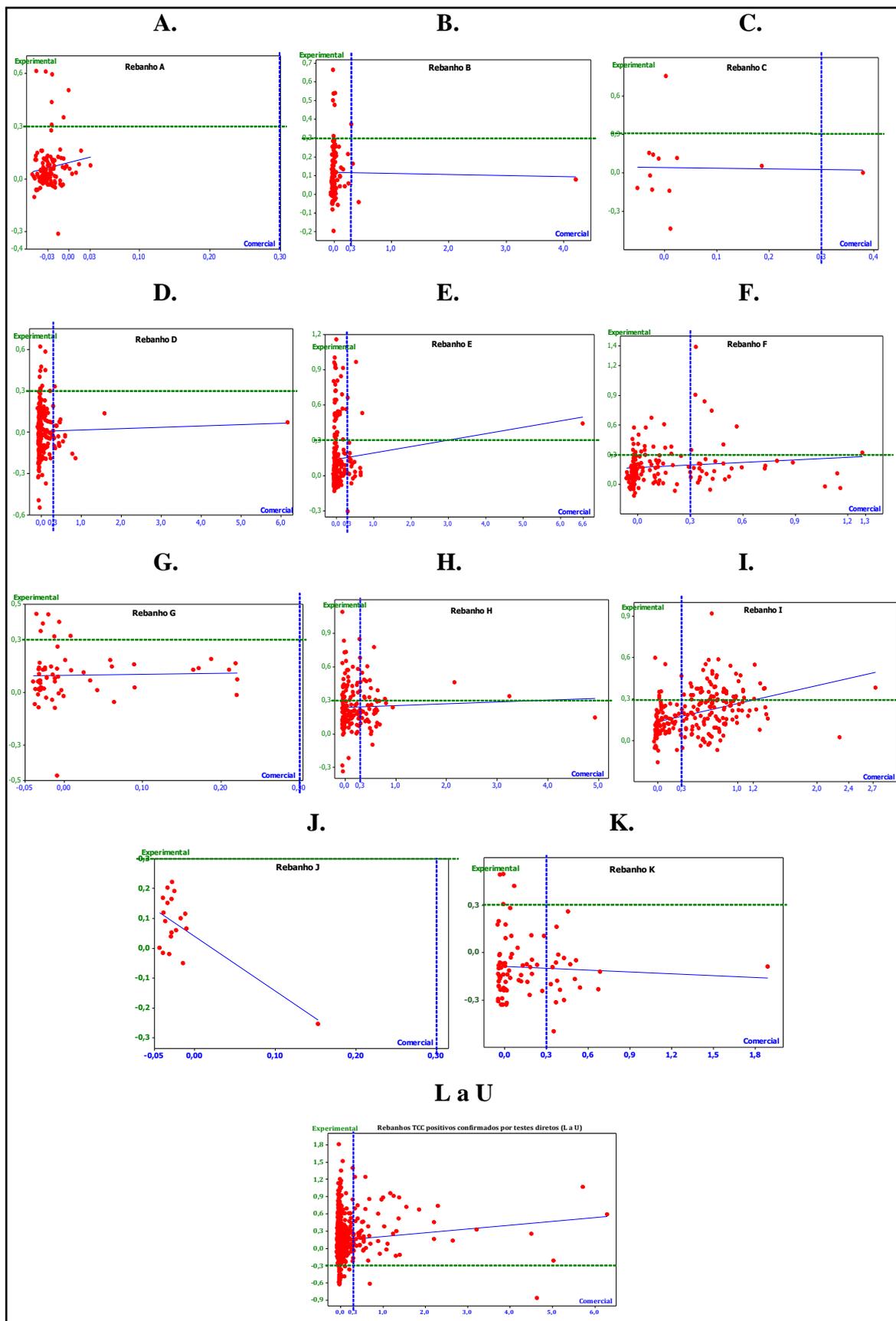


Figura 5 – Dispersão dos resultados do ELISA experimental (y) versus comercial (x) (razão S/P), por rebanhos (de A a U) e agrupados nas linhas: o ponto-de-corte (0,300) está marcado pelas linhas pontilhadas (verde = experimental; azul = comercial) linha de tendência para regressão linear

3 ARTIGO 2**False-negative results in comparative tuberculin test
produced by similar swellings in avian and bovine sites of injection****VIDAL, C. E. S.; VARGAS, A. C.**

(a ser submetido à publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira ou outro periódico científico sob consideração da banca)

ABSTRACT

Intradermal tuberculin tests are the most widely used methods to detect cattle infected by *Mycobacterium bovis* worldwide and the comparative cervical tuberculin (CCT) test is reputed to have high specificity. As both avian and bovine PPD tuberculins used in the CCT have common antigens, the swellings in the sites of inoculation of PPD tuberculins can occur with similar intensities. These similar swellings can make the difference of thickness of the skin-fold become null or in the frame of negative or inconclusive results when, in reality, some of these animal are infected by *Mycobacterium bovis*. We intend here to highlight to the veterinary practitioners accredited by the Ministry of Agriculture doing the diagnostic tests for the control of bovine tuberculosis that this phenomenon of swelling in both inoculation sites together is a possible cause for false-negative results at the CCT test. For this purpose, a retrospective observational study has been done to assess the results of two CCT herd tests applied subsequently to a dairy herd of 127 cattle, 108 days apart from each other. Positive reactants and inconclusive animals in one herd test were kept to another one, done by the same veterinarian in the entire herd for whatever other reason than this study, but conferred more confidence to his results and allowed comparisons. After the second herd test, positive reactant animals were culled and slaughterhouse inspection and histopathology findings were compared to the results of CCT tests. There was a predominant profile of positive-reactants at the site of inoculation of both avian and bovine PPD tuberculins with over 4.0 mm, and 7 up to 10 cows that tested negative firstly, had positive reactant results later. Animal with this profile were confirmed to have lung lesions at the slaughterhouse inspection, findings related to the presence of granuloma in the histopathology and acid-fast bacilli at the

Ziehl-Neelsen staining. There were no signs of Johne's disease in the 31 cows examined, although other non-specific mycobacterial infections have not been specifically searched. The swelling in both sites of tuberculin inoculation should be considered and serves as an alert to the veterinary practitioner under the risk of not clearing the herd of tuberculosis, even when the differences between them are less than 4.0 mm. More data from experiments in real condition ought to be assembled from more herds to assure the best level of security for the cut-off of the CCT test, mainly in condition of high prevalence. While the present rules are maintained, the use of the CCT as a routine test would depend on the special epidemiological condition of each herd.

KEY-WORDS: bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, skin-test, intradermal, cattle diseases

INTRODUCTION

Brazil has started in the year 2001 a National program to control animal brucellosis and tuberculosis (PNCEBT) in a centrally organized action to standardize rules and procedures over the territory. Since then, all the possible actors have been involved to give their contribution to reduce the prevalence of both diseases. Although epidemiological surveys have been done for brucellosis in most of the states, the surveys of tuberculosis have just started. At the same time, as the PNCEBT is turning the first decade, the procedures to convert from the control to the eradication stage in some areas, also the strategy to audit the program through surveillance methods are being suggested to be revised (ARAMBULO, 2008). In any case, the accuracy (sensitivity and specificity) of tests being used represent a serious limitation for the control and eradication of tuberculosis all over the world and the PNCEBT considers the necessity of evaluating the tests and using the best available methods adaptable to the logistics and all epidemiological characteristics.

The only official diagnostic tests available to control bovine tuberculosis in the Brazilian territory so far are tuberculin tests (BRASIL, 2004*b*). For dairy cattle, veterinary practitioners officially accredited by the Brazilian Ministry of Agriculture are allowed to use only the single cervical tuberculin (SCT) test or the comparative cervical tuberculin (CCT) test. The use of the caudal fold test (CFT) is exclusively authorized to be used for beef cattle. It is allowed only for monitoring the herds. SCT is considered to be the routine test and the CCT, the confirmatory one.

The doses of tuberculin used for the CCT according to the Brazilian legislation are 0.1 mg and 0.05 mg (in 0.1 ml each) for bovine and avian PPDs (3,250 and 2,500 UI/dose), respectively (BRASIL, 1994; BRASIL, 2006*a*), similar to those recommended by the OIE (2009). However, the cut-off points established by the Brazilian rules include the decimal fraction of the mm, *i. e.*, inconclusive ≥ 2.0 mm, and positive ≥ 4.0 mm, either for the SCT and CCT, and, for the CCT, the difference of increased thickness of the skin-fold between the bovine minus avium is the number considered for those cut-off points. For the CCT, clinical signs, such as diffuse or extensive oedema, exudation, necrosis, pain, consistency or inflammation of the lymphatic ducts are not taken into account as they are for the SCT. And, for the CCT, the OIE (2009) considers inconclusive any difference of the skin-fold at the site of injections from 1 to 4 mm. The OIE recognizes that more stringent interpretation is used for example for high risk

population or in contact animals. As tests are carried out in the field condition, they depend on a set of variables, and results tend to have difficult assessment, understanding and comparison (MONAGHAN et al., 1994). Sensitivity of serial CFT-CCT tests carried out abroad was calculated through a meta-analysis ranging from 74.4 to 88.4% and specificity from 97.3 to 98.6% (FARNHAM et al., 2011).

Each test has its advantages and disadvantages. Brazilian rules consider that after the SCT (or CFT, exclusively for beef cattle) as routine test with inconclusive or positive result, a confirmatory test should be used, although, depending on the epidemiological circumstances and the veterinary practitioners' decision, the animal can be considered positive. When an animal is inconclusive twice in a confirmatory test, it must be considered positive. A specific Brazilian rule (BRASIL, 2004a) considers the use of CCT as a routine test in three special situations: certified free-herds; herds with historic of non-specific reactions; and buffalos. Nevertheless, as farm owners are not enforced for testing their animals, except for animal shows, inter-state transit (except directly to slaughterhouses) and the certification processes (that are on an involuntary basis), and prevalence of tuberculosis is still high, veterinarians prefer to use the confirmatory CCT test at first. This procedure assures to them that, in case of positive reactants, animals will be marked, instead of waiting at least 60 days (ideally 90 to 120 days) and not depending on the owner's decision to accept retesting the entire herd again.

It could be assumed that the possibility of false-negative results in CCT due to the diminished difference between both sites of swelling the skin-fold shall occur mostly in high prevalence condition. Monaghan et al. (1994), in a review about the tuberculin test, have mentioned all conditions for false negative, but did not refer to this one.

The objective of this study was to report a possibility of simultaneous reaction to both bovine and avian tuberculin that annul the necessary linear difference of 4.0 mm officially established as the National Brazilian cut-off point for positives at the CCT test, that can either maintain tuberculous cattle in the herds or even underestimate the prevalence in official surveys, going on at this time all over the country. The apparent prevalence was assessed by the inspection service and the histopathology.

MATERIAL & METHODS

The study design: a retrospective observational study has been carried out to assess the results of two comparative cervical tuberculin (CCT) herd tests applied subsequently to a dairy herd of 126 cattle. Positive reactant and inconclusive animals in the 7th herd test were kept to the following herd test 108 days later. After the following herd test, cows were culled and slaughterhouse inspection findings were compared to the results of CCT tests and also to the histopathological findings. A veterinary practitioner officially accredited by the Brazilian Ministry of Agriculture for diagnosis and certification service has carried out all CCT tests. One federal veterinary officer has been coordinating all slaughterhouse inspection service and one veterinary pathologist has done all histopathological exams in a blind system, so they would not know that the results would be cross compared. All three have had about 30 years or more time of experience in their area and they were not aware that their results would be cross studied. At the slaughter, a team coordinated by the pathologist of a federal university from Rio Grande do Sul state (Brazil) has collected, organized and taken the samples in formalin to the lab for histopathological examination. If other disease condition was found, related to Johne's disease for instance, material would be also collected for differential diagnosis.

The herd: The herd was a pure pedigree Holstein-Friesian divided into 8 lots of cattle (n; %, respectively): 1. "heifers in the stockyard" (24; 19.05), "milking cows" (61; 48.41), "in-house heifers" (8; 6.35), dried cows (13; 10.32), calves "grazing barley" (5; 3.97), "in-house calves" (6; 4.76), calves "in the milk" (3; 2.38) and cows "in paddock" (6; 4.76). The historic of the herd test showed that 6 herd tests were carried out before these studied here and one herd test later on (**Table 1**).

Diagnostic tests: the CCT tests were applied to all cattle over 6 weeks of age and were compiled through copies of the control-table of tuberculin animals (BRASIL, 2006b) and test result documents (BRASIL, 2006c). The animals were classified according to the intradermal tests as positive (reactant), inconclusive or negative (non-reactant), according to the cut-off points of the PNCEBT, *i. e.*, negatives < 2.0 mm, inconclusive \leq 3.9, and \geq 4.0 positive. The animals with two inconclusive results were considered positive. The measures of the skin fold were taken with an electronic digital caliper ⁽²⁾ with internal spring, and a led with 3 decimals of the millimeter. The CCT test results

² Source acquisition: ref. 33880-01 - MTV, Germany <http://www.lidersulcomercial.com.br/tuberculina.htm>

were read 72 h post-inoculation taking two decimals of the millimeter and analyzed especially considering delta A (ΔA) and delta B (ΔB), the difference between each other ($\Delta B - \Delta A$) and the relationship with the final results of the 8th CCT individual and herd test. All other condition of the test were those standardized by the PNCEBT and a routine test in a recognize focus of bovine tuberculosis, including the pressure of the presence of the farm owner, but nobody else involved on veterinary studies nor research was present at the time of tests were carried out.

Samples from slaughtering: samples of lymph nodes (LFN) or tissues with lesions suggestive of tuberculosis were collected in formalin at the sanitary slaughtering procedure in individual and identified bottles and sent to the pathology laboratory, for histopathology and Ziehl-Neelsen (ZN) staining for acid-fast bacilli (AFB).

Results analyzed: the animals included in the trial were those inconclusive or positive for the CCT at the 7th and/or the 8th herd test. The same profile was searched at the rest of the whole group ($n = 126$ minus $36 = 90$). The profiles formed by the combination of results to the avian and bovine tuberculin PPDs and the results of delta B minus delta A were tabulated in columns of an electronic spread-sheet for calculations.

Quantitative analysis: the results of measures with the caliper in millimeters were submitted to exploratory and descriptive analysis and tested in explorative statistics to look for correlation and agreement. The software used for the scattered graph was the Minitab® version 16.1.0 for Windows (© 2010 Minitab Inc.).

RESULTS AND DISCUSSION

The history of the herd revealed that 7 cows (7.3%) were diagnosed inconclusive 3 years and a half before the 7th test showed here. Curiously, those cows were retested only one year and a half later together with the entire herd and became negative (non-reactant). Five of those were retested with the entire herd 4 times until the herd tests studied, when two of those 7 became inconclusive or positive and were discarded. It seems that the fact of leaving inconclusive individuals for a long time was a favorable condition for such an outbreak situation found later.

In the 7th herd test (the first analyzed for this article), only 3 of the 19 positive animals were immediately isolated, plus one negative cow ($\Delta B = 11.40$ mm; $\Delta A = 10.43$ mm; $\Delta B - \Delta A = 0.97$ mm), and they were sent for sanitary slaughter (**Table 2:** cow nr. 34-37). Two of these four culled cows were classified at the slaughterhouse inspection

as “generalized tuberculosis and cachexia” (destination: total condemnation; rendered plant) and the other two had lung lesions, and the destinations of these were sterilization by heating treatment for canned meat. Three out of the four were in the milking group (lot 2) and the other one came from a group called “heifers in the hose” (lot 1). The other 16 positives and the 7 inconclusive were kept for the following herd test. Thirteen of the 19 (72.2%) positives and 3/6 (50%) of inconclusive results came from cows from the milking group. Parturition seems to be an immunological suppressor factor, but it is not well determined in which extent it is confused with nutrition and genetics (PHILLIPS et al., 2002).

At the 8th herd test, 15 up to 16 (93.75%) of the remaining positive cattle from the previous herd test were confirmed positive and 5 up to 6 inconclusive became positive. The remaining positive cow was inconclusive and it was also culled, but the remaining inconclusive one was then negative (cow nr. 39). However, other 7 firstly negative have turned positive, plus two that have turned inconclusive. Modeling data estimates that the excretion of the bacteria begins about 87 days after the infection (NEILL et al., 1991) and the detection of the infection by intradermal tests would spend around the same time, but it will depend on the intervals between tests. The 27 positive reactants and 4 inconclusive at the 8th herd test were sent to the sanitary slaughter, they were inspected and had samples collected.

Considering the dynamics of the results of the herd tests (**Table 1**), 13 (10.4%) inconclusive or negative animals at the 7th herd test became positive in the 8th herd test and only two of these were neither confirmed positive by the slaughterhouse inspection nor by the histopathology diagnostic. Müller et al. (2009) highlighted that the cost of a false negative diagnosis would exceed the cost of a false positive by several folds, as disease transmission amplifies the total economic losses due to the bovine tuberculosis. Other 3 negative results became inconclusive at the 8th herd test. The agreement between herd test results beyond chance ($\kappa = 61.68\%$) was considered good (FLEISS, 1981).

Most of the 39 cattle included in this study (27/38 = 71.05%; one missing result) were classified as positive to both tuberculin. Nine combinations (3²) were possible for profiles of results for individual CCT test result: the first position for avian PPD tuberculin and the second for bovine and then, 3 possible results for each: negative (N), inconclusive (2.0 ≤ I < 4.0 mm of difference) and positive (P ≥ 4.0), as the

cut-off-points. Thus: N & N; N & I; N & P; I & N; I & I; I & P; P & N; P & I; P & P were the profiles for the CCT, being P & P the predominant (19/25; 76%) of inconclusive and positive results at the 7th test. However, being either I or P for avian PPD tuberculin represented 33 of the 39 (84.6%) positive or inconclusive animals in one or another test, two of these were not slaughtered and 4 were considered false-positives (3 of these were P & P and one P & N) and carcasses directly used for human consumption, although two were CCT positive twice (**Table 2**). This means that most were positive, but non-specific reactions do occur, and in this case, slaughterhouse inspection disagrees with the CCT test results.

Other columns were final results in the 7th and the 8th herd tests and binary (yes or no) results for lesions/condemnation of (*pieces*) head, tongue, lungs, liver, intestine, carcass and destination (three possibilities: liberated, partially condemned to sterilization cooked/canned-meat or total condemned – to the rendering plant) for the slaughterhouse inspection. Lung lesion plus any other primary or secondary local lesion gave reason to condemnation. The only exception was a female calf (nr. 27), with lesions only on the head. At the histopathology, the combination of 16 possible findings formed the profiles for the different *pieces* (**Table 2**). The predominant description of histopathology was mild lymphoid hyperplasia, caseous necrosis, dystrophic calcification, epithelioid macrophages, giant cell and neutrophils surrounded with fibrous connective tissue.

A straight line indicating 4.0 mm of difference between the swellings at the site of inoculation of each tuberculin divides the group of positive animals from the rest of the herd for the 7th test (**Figure 1**). In the group of the rest of the herd, 56 (60%) were positive to both bovine and avian PPDs, and they were all negative to the CCT. It is possible to note that an important part of the results (46/126; 36.5%) associate swelling in both sites of avian and bovine PPD inoculation greater than 4.0 mm and were not positive at the CCT. Only other 6 animals resulted inconclusive ($2.0 \leq \Delta B$ minus $\Delta A < 4.0$), if the possibility legally given to the accredited veterinarians of including inconclusive results as positive-reactants is considered. However, this is not enough to exclude all the other that came positive in the 8th herd test, in order to avoid opportunity to transmission.

Fourteen patterns of results at the slaughterhouse inspection were reported (**Table 1**). The predominant pattern seen was lung lesion alone, with 9/31 cows

(29.03%), followed by lung and intestine only on 3/31 (9.68%). All carcasses of both patterns were sent for canned-meat. However, we considered another pattern for other two cows with lung and intestine condemned that, because of the extension of findings, the meat inspector totally condemned the carcasses (to the rendering plant). Importantly, when the presence of lung lesions and the first 10 profiles of lesion are considered, the results of the slaughterhouse inspection agreed in 100% with the pathological diagnosis. At the slaughterhouse inspection, there were no lesions in four of the 31 inspected cattle and these plus four other, although having some findings at the histopathology, had no-presence of AFB so had negative final pathological diagnosis (**Table 2**). Pathological findings were classified according to their occurrence in each sample and individual cattle. There existed a predominant pattern that determined the diagnosis of bovine tuberculosis in 23 of the 31 cattle, according to the histopathology point of view.

Nevertheless, comparing the CCT tests results, the slaughterhouse inspection and the histopathology findings obtained, it was not possible in this sample to discriminate the positive and inconclusive animals from those 4 destined neither for human consumption nor to the 8 pathologically negative ones. Tuberculin detected 31 (24.4%) positives in one or another herd test from the 127 cattle of the herd at the 8th test, and left one inconclusive that was detected by both inspection and pathology. Instead of using the terms sensitivity and specificity when the same test was compared for the same animals in two different herd tests carried on by the same veterinarian (**Table 3**), co-positivity and co-negativity were the preferred terms used (BUCK & GART, 1966). Sensitivity of inspection or pathology could not be assessed in this observational and retrospective study, provided only positive and inconclusive individual results, except one, were submitted to slaughtering and samples collection. Twenty two up to 39 (56.4%) cows positive and/or inconclusive to one or another test ranged from 4 to 6 years old. The oldest ones were 11 years old and the 3 youngest ones were one year old (except an outlier of 4 months and 23 days of age at the date of the 8th test). It means that the disease is not confined to the oldest cows and transmission seems to be happening sometimes very early in life.

The most relevant results obtained in this work were related to the profiles of the reactions to each tuberculin in the 7th test, whose results at the 8th herd test were compared to, and slaughterhouse inspection and histopathology findings described. A

bias should be considered as the accredited veterinarian carrying on the CCT would know the previous result he obtained or at least could be asking about them at the time of reading the tests. On the other hand, the diagnostic made independently by the meat inspector and by the pathologist on histopathology agreed in all cattle positive and inconclusive conclusion of these. It should be also considered that cattle with PPD positive reactions not always show visible lesions during slaughter in the abattoir (COSTELLO et al., 1997), due to insensitivity of the slaughterhouse inspection. Liebana et al. (2008) reported sensitivity of 79.8% for CCT (72.3-86.2^{3*}), 88.7% for visible lesions (82.4-93.3^{3*}), 92.9% for histopathology (87.9-96.1^{3*}), and specificity of 64.9% for CCT (59.3-70.4^{3*}), 89.8 for visible lesion (85.9-93.0^{3*}) and 97.4% for histopathology (95.2-98.9^{3*}), in England and Wales in experimental condition. Moreover, this case came to the slaughter with all possible warnings to the inspection service, what makes to have more sensitivity to detect lesions than routinely.

The imperfections of diagnostic tests to define when cattle are or not infected by *Mycobacterium bovis* have challenged veterinary practitioners at the decision making (HARTNACK & TORGERSON, 2012) especially when they face positive results (CRUZ et al., 2011), when they depend on cattle owners as clients or supporters (FAIRCHILD & OPPENHEIMER, 1998) and have to explain to them how this bacterium is still able to survive (PALMER & WATERS, 2011), despite more than one century of scientific research, strong efforts to eradicate the disease and the amazing progress the humanity has experienced (WEISS & McMICHAEL, 2004). Nonetheless, enormous efforts have been made to establish free areas of bovine tuberculosis in developed countries, using the available imperfect tests (GRIFFORE & PHENICE, 2008).

At the same time that sensitivity and specificity super-poses in any chosen cut-off, selection of cattle for certain characteristics, like being sensitive to tuberculin should be taken into account (AMOS et al., 2013). With the results of this single farm with high prevalence of bovine tuberculosis in two herd tests, it would be impossible to propose any measure like changing the cut-off points of the CCT. However, the use of this test in a condition of presence of non-specific infection and high prevalence of tuberculosis, it seems that using the normal rules will miss too many infected individual through the CCT. The reduction of the apparent prevalence (**Table 2**, 9th herd test) could mean in this case that a selection of genetically non-responsive

³ * Confidence interval = 95%

animals (AMOS et al., 2013) will lead us to use other alternative tests, and at least as hypothesis another selection will start to be made for insensitivity to those other tests, even though testing for humoral immunity.

CONCLUSION

Cattle tested through the comparative cervical tuberculin (CCT) test and reacting to both tuberculin PPDs simultaneously are being missed as positive reactants by the veterinary practitioners, when only the difference of the swelling at the skin-fold is measured by the caliper and the cut-off point of 4.0 mm of difference between bovine and avian sites is considered. In high prevalence condition and/or presence of non-specific mycobacterial infection and/or for the tuberculosis survey it would be probably recommended to consider that when both avian and bovine sites of injection are swollen the results should be taken cautiously. More studies using other farms following positive and negative CCT animals at the slaughterhouse inspection to collect samples to be analyzed are necessary.

BIBLIOGRAPHY

- AMOS, W. et al. Genetic predisposition to pass the standard SICCT test for bovine tuberculosis in British cattle. PLOS One, v. 8, n. 3, p. 1-8 e-58245, 2013.
- ARAMBULO, P., 3rd. International programs and veterinary public health in the Americas: success, challenges, and possibilities. Preventive Veterinary Medicine, v. 86, n. 3-4, p. 208-215, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006a. p. 61.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa-SDA nº. 30, de 7 de junho de 2006. Normas de habilitação de médicos-veterinários que atuam no setor privado, para fins do PNCEBT: Anexo V. Diário Oficial da União, Brasília (DF), n. 114, seção 1: 5-7, (16/06). 2006b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa-SDA nº. 30, de 7 de junho de 2006. Normas de habilitação de médicos-veterinários que atuam no setor privado, para fins do PNCEBT: Anexo III. Diário Oficial da União, Brasília (DF), n. 114, seção 1: 5-7, (16/06). 2006c.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa-SDA nº. 59, de 24 de agosto de 2004. Altera o Art. 32 do Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial da União, Brasília (DF), n. 165, seção 1: 10, (26/08). 2004a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa-SDA nº. 6, de 18 de janeiro de 2004. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial da União, Brasília (DF), n. 7, seção 1:6-10, (12/01). 2004b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria-SDA nº. 64, de 18 de março de 1994. Normas de produção, controle e emprego de tuberculina. Diário Oficial da União, Brasília (DF), seção 1: 4198, (23/03). 1994.
- BUCK, A. A.; GART, J. J. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. American Journal of Epidemiology, v. 83, n. 3, p. 586-592, 1966.
- COSTELLO, E. J. et al. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. Veterinary Record, v. 141, n. 9, p. 222-224, 1997.
- CRUZ, C. E. F. Records of performance and sanitary status from a dairy cattle herd in southern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2011.
- FAIRCHILD, A. L.; OPPENHEIMER, G. M. Public health nihilism vs pragmatism: history, politics, and the control of tuberculosis. American Journal of Public Health, v. 88, n. 77, p. 1105-1117, 1998.
- FARNHAM, M. W. et al. Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. Preventive Veterinary Medicine, v. 103, n. 2-3, p. 234-242, 2012.

- FLEISS, J. L. Statistical methods for rates and proportions. 2 ed. John Wiley ed., New York. 1981. p. 212-236.
- GRIFFORE, R. J. & PHENICE, L. A. Farm families and bovine tuberculosis: a critical perspective. Critical Social Work, v. 9, n. 1, 2008. <http://uwindsor.ca/criticalsocialwork/farm-families-and-bovine-tuberculosis-a-critical-perspective>
- HARTNACK, S.; TORGERSON, P. R. The accuracy of the single intradermal comparative skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis-estimated from a systematic literature search. Journal of Mycobacterial Diseases, v. 2, n. 6, p. 1-5, 2012. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1068.1000120>
- LIEBANA, E. et al. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. Veterinary Journal, v. 176, p. 354-360, 2008.
- MONAGHAN, M. L. et al. The tuberculin test. Veterinary Microbiology, v. 40, p. 111-124, 1994.
- MÜLLER et al. Bayesian receiver operating characteristic estimation of multiple tests for diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. PLOS One, v. 4, n. 12, e8215, 8 p., 2009.
- NEILL, S. D.; O'BRIEN, J. J.; HANNA, J. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. Veterinary Microbiology, v. 28, p. 103-109, 1991.
- OIE. Bovine tuberculosis. In: OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.4.7. 2009. 16 p. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf
- PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Bovine tuberculosis and the establishment of an eradication program in the United States: role of veterinarians. Veterinary Medicine International, v. 2011 (2011), Article ID 816345, 12 p.
- PHILLIPS, C. J. C.; FOSTER, C. R. W.; MORRIS, P. A.; TEVERSON, R. Genetic and management factors that influence the susceptibility of cattle to *Mycobacterium bovis* infection. Animal Health Research Reviews, v. 3, n. 1, p. 3-13, 2002.
- WEISS, R. A.; McMICHAEL, A. J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. Nature Medicine, v. 10, n. 12 (Suppl), p. 70-76, 2004.

Table 1 – History of herd tuberculosis: intervals between herd tests and number of animals diagnosed and discarded in each herd test

Cattle (n)	Herd test	Interval between tests (days)	Positives / tests (n)	Inconclusive test results(n)	Discarded (n)	Prevalence (%)	Animals with lesion / slaughtered
82	1 st	-	0/79	0	0	0	-
102	2 nd	216	0/96	7	0	0	-
90	3 rd	466	0/81	0	0	0	-
105	4 th	171	0/100	0	0	0	-
103	5 th	140	0/102	0	0	0	-
120	6 th	235	0/119	0	0	0	-
126	7th	311	19/126	7	4	15.08	4/4
135	8th	108	27/129	5	31	20.93	28/31
97	9 th	121	3/96	9	10	3.12	-

Legend: The herd tests in bold numbers are the ones analyzed in this study.

Positive and inconclusive results refer to the cervical comparative tuberculin (CCT) test with the following cut-off points: $\Delta B - \Delta A =$ negative < 2.0 mm \leq inconclusive < 4.0 mm \leq positive

Table 2 – Clinical data, slaughterhouse inspection and histopathology findings in 39 animals examined

Nr	Born	Lot	Av&Bov	7th test	8th test	Head	Tongue	Lung	Liver	Intestine	Carcass	Destination	Inspect	Tonsils	Lymphnodes	Lung	Rumen	Liver	Skeletal Muscl	ZN (LFN)	Pathol final dia
1	23/05/10	3	P & P	Inconclusive	Positive	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	rendering plant	A		1, 3, 5, 6, 7 e 8		13			AFB +	BovTB Positive
2	25/10/06	2	N & I	Negative	Positive	No	No	Yes	Yes	Yes	No	rendering plant	B		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
3	02/03/07	2	I & P	Positive	Positive	No	No	Yes	Yes	No	Yes	rendering plant	C		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
4	19/09/05	2	P & P	Positive	Positive	No	No	Yes	Yes	No	Yes	rendering plant	C		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
5	21/04/04	2	P & P	Negative	Positive	No	Yes	Yes	Yes	No	No	rendering plant	D		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
6	30/06/08	2	P & P	Positive	Positive	No	No	Yes	Yes	No	No	rendering plant	E		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
7	10/08/01	4	P & P	Negative	Inconclusive	No	No	Yes	Yes	No	No	rendering plant	E		1, 3, 5, 6, 7 e 8			11		AFB +	BovTB Positive
8	25/11/07	2	P & P	Negative	Positive	No	No	Yes	No	Yes	No	rendering plant	F		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
9	14/10/07	2	I & P	Positive	Positive	No	No	Yes	No	Yes	No	rendering plant	F		1, 3, 5, 6, 7 e 8	3, 5, 6 e 7				AFB +	BovTB Positive
10	01/12/06	2	P & P	Positive	Positive	No	No	Yes	No	Yes	No	heating treatment	G		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
11	28/08/06	2	P & P	Positive	Inconclusive	No	No	Yes	No	Yes	No	heating treatment	G		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
12	12/08/08	2	P & P	Inconclusive	Positive	No	No	Yes	No	Yes	No	heating treatment	G		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
13	12/02/03	4	P & P	Inconclusive	Positive	No	Yes	Yes	No	No	No	heating treatment	H		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
14	01/03/07	2	N & P	Inconclusive	Positive	No	No	Yes	No	No	Yes	heating treatment	I		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
15	06/02/08	2	P & P	Positive	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8	3, 5, 6 e 7				AFB +	BovTB Positive
16	22/07/06	2	P & P	Negative	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
17	04/11/07	2	N & P	Positive	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
18	03/01/06	2	P & P	Positive	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
19	02/12/06	4	N & P	Positive	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
20	22/05/05	2	N & I	Negative	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
21	14/04/08	2	I & P	Positive	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8					AFB +	BovTB Positive
22	24/07/07	4	P & P	Positive	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8			6, 7 e 8		AFB +	BovTB Positive
23	12/05/03	2	P & N	Negative	Positive	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment	J		1, 3, 5, 6, 7 e 8	15 e 16				AFB +	BovTB Positive
24	15/01/05	2	P & P	Positive	Positive	No	No	No	Yes	Yes	No	heating treatment	K		2 e 9					AFB -	BovTB Negativ
25	01/05/04	2	P & P	Negative	Inconclusive	No	No	No	No	No	Yes	heating treatment	L		1 e 9	4 e 14				AFB -	BovTB Negativ
26	01/06/07	2	P & P	Inconclusive	Positive	No	No	No	No	No	Yes	heating treatment	L		1					AFB -	BovTB Negativ
27	14/02/11	7	NT	NT	Inconclusive	Yes	No	No	No	No	No	heating treatment	M	4 e 12	2					AFB -	BovTB Negativ
28	11/03/10	1	P & N	Negative	Positive	No	No	No	No	No	No	Human consumpt	N		1 e 10					AFB -	BovTB Negativ
29	22/08/05	2	P & P	Positive	Positive	No	No	No	No	No	No	Human consumpt	N		1					AFB -	BovTB Negativ
30	31/08/05	2	P & P	Negative	Positive	No	No	No	No	No	No	Human consumpt	N		9					AFB -	BovTB Negativ
31	23/10/07	2	P & P	Positive	Positive	No	No	No	No	No	No	Human consumpt	N		1 e 9 (multifocal)					AFB -	BovTB Negativ
32	31/05/08	2	P & P	Positive	Positive	No	No	Yes	Yes	No	Yes	rendering plant	C	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
33	05/07/06	2	P & P	Negative	Inconclusive	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
34	25/04/00	2	P & P	Negative	Slaughtere	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	04/03/00	2	P & P	Positive	Slaughtere	No	No	No	No	No	Yes	rendering plant		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
36	17/04/05	2	P & P	Positive	Slaughtere	No	No	No	No	No	Yes	rendering plant		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
37	03/04/10	1	P & P	Positive	Slaughtere	No	No	Yes	No	No	No	heating treatment		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
38	25/07/05	2	P & P	NT	NT	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
39	05/06/09	1	P & I	Inconclusive	Negative	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Legend: Born (date of birth): DD/MM/YY; Av&Bov: avian and bovine tuberculin PPD results of the 7th herd test: I = Inconclusive; N = Negative (non-reactant); P = Positive reactant. Lot (group of animals in the farm): 1 heifers in the stockyard, 2 milking cows, 3 in-house heifers, 4 dried cows, 5 calves grazing barley, 6 in-house calves, 7 calves in the milk, and 8 cows in paddock. 7th CCT herd test: March 18, 2011, 8th CCT herd test: July 07, 2011. Destination: rendering plant; heating treatment; human consumption. Pathology findings: 1mild lymphoid hyperplasia, 2 marked lymphoid hyperplasia, 3 caseous necrosis, 4 areas of caseous necrosis, 5 dystrophic calcification, 6 epithelioid macrophages, 7giant cell, 8 neutrophils surrounded with fibrous connective tissue, 9 mild hemosiderosis, 10 slight histiocytic infiltrate, 11multifocal lymphohistiocytic infiltrate, 12 histiocytic infiltrate with clumps of bacteria, 13 serosa with intense infiltrate of lymphocytes and epithelioid macrophages, 14 pyogranulomatous bronchopneumonia,15 interlobular septal edema, 16 chronic pleuritis; ZN: Ziehl-Neelsen, LFN: lymph node, AFB: acid-fast bacilli, NT: non-tested, NS: non-sampled

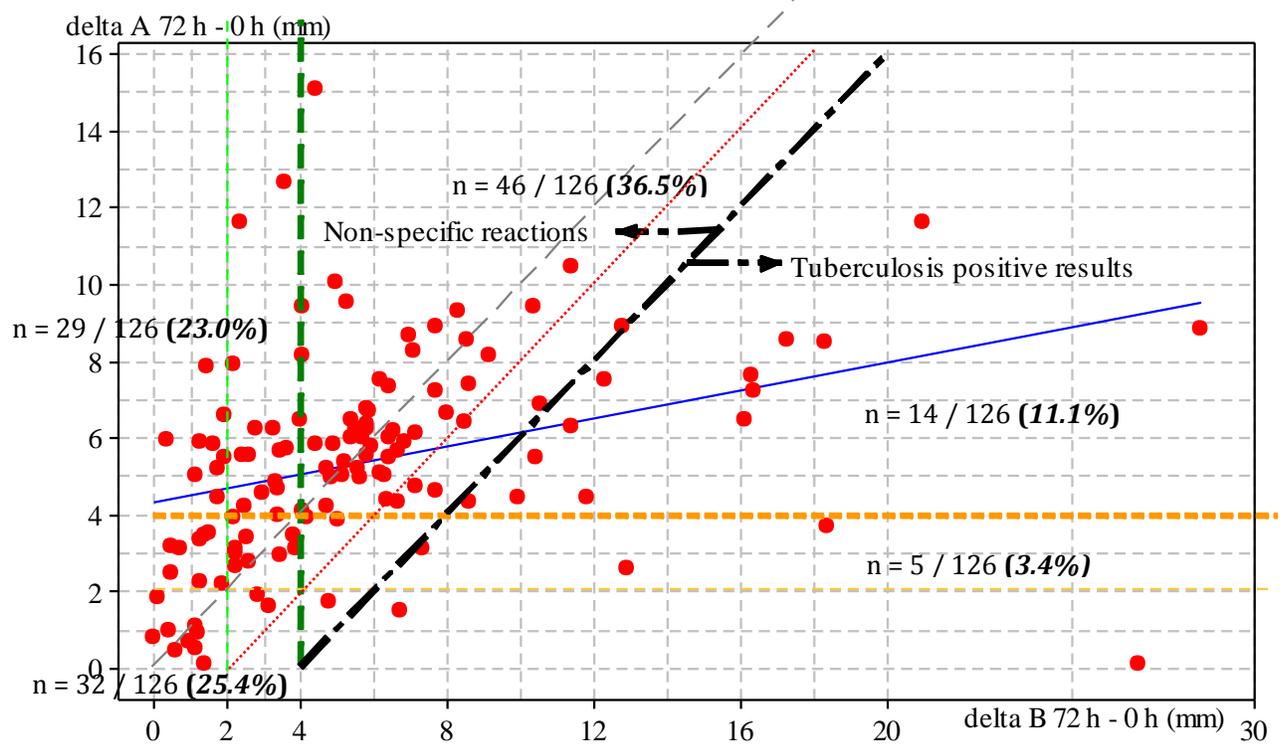


Figure 1 - Skin fold measurement of bovine (x) versus avian (y) PPD tuberculins (n = 126)
Regression fit curve equation between avian and bovine results:

$$\Delta A = 4.344 - 0.1820 \Delta B (r^2 = 0.117)$$

Table 3 – Results of cervical comparative tuberculin (CCT) tests used subsequently twice (108 days apart) in a naturally infected dairy cattle herd by the same officially accredited veterinary practitioner: 2 x 2 table

		8 th . CCT test		
		Positive	Negative	Total
7 th . CCT test	Positive	15 (12.5%)	1 (0.8%)	16 (13.3%)
	Negative	13 (10.8%)	91 (75.7%)	104 (86.7%)
	Total	28 (23.3%)	92 (76.7%)	120

Legend:

Inconclusive = Negative; Co-positivity = 53.57%; Co-negativity = 98.91%

Positive predictive value = 93.7%; Negative predictive value = 87.5 %

Apparent prevalence = 13.3%; True prevalence = 23.3%

Overall agreement = 88.3%

kappa agreement = 61.7%: **good** agreement beyond chance, 0.4 to 0.75 (Fleiss, 1981)

All animals tested in both opportunities were included.

4 CONCLUSÃO

Os testes diagnósticos para determinar quais bovinos estão infectados por *M. bovis* são imperfeitos.

A sua aplicação correta é importante para que a diminuição da prevalência nos rebanhos seja conseguida.

O uso continuado de testes tuberculínicos isoladamente parece estar sendo insuficiente para erradicar a infecção dos rebanhos comerciais.

Os testes imunenzimáticos ELISA detectam outros bovinos e outros rebanhos infectados, que os testes de tuberculinização não conseguem detectar.

O seu uso para detectar esses rebanhos e animais depende de mais estudos, para ajustar a sua precisão às condições que se encontram no campo.

O uso de mais e melhores antígenos indica que é possível que mais indivíduos já estejam infectados, ainda que a ocorrência de lesões não tenha indicado essa relação direta.

A certificação de estabelecimentos de criação como livres de tuberculose bovina demandará testes diagnósticos e estratégia que impeçam que a infecção permaneça por mais tempo em níveis que parecem imperceptíveis, desconsiderando que a bactéria se multiplica e que em condições diferentes para hospedeiro e de ambiente, as dificuldades para a sua erradicação podem ser ainda maiores.

Este estudo verificou também que o uso do teste cervical comparativo em determinada condição de alta prevalência pode exigir que o ponto-de-corte linear que a regra determina deve merecer a atenção e conhecimento do veterinário para que a detecção dos animais infectados nos rebanhos não seja ainda mais lenta.

Os testes ELISA merecem mais estudos para que possam ser utilizados o mais brevemente possível.

REFERÊNCIAS

- AMANFU, W. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. **Tuberculosis**, v. 86, p. 330–335, 2006.
- AMOS, W. et al. Genetic predisposition to pass the standard SICCT test for bovine tuberculosis in British cattle. **PLOS One**, v. 8, n. 3, p. 1-8 e-58245, 2013.
- ANTUNES, J. L. F.; MORAES, M. de; BIAZEVIC, M. G. H.; WALDMAN, E. A.; CORRÊA, M. O. A. Tuberculose e leite: elementos para a história de uma polêmica. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 9, n. 3, p. 609-23, 2002.
- ARAÚJO, C. P. **Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação pela reação em cadeia da polimerase**. Campo Grande, MS, 2004. UFMS (Dissertação Mestrado), 57 p.
- ARAÚJO, F. R. 2011. (comunicação pessoal).
- BARAJAS-ROJAS, J. A.; RIEMANN, H. P.; FRANTI, C. E. Notes about determining the cut-off value in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, n. 3, p. 231-233, 1993.
- BLACK, C. A. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. **Dermatology Online Journal**, v. 5, n. 1, p. 7, 1999.
- BLANCO F. C. et al. Study of the immunological profile towards *Mycobacterium bovis* antigens in naturally infected cattle. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 8, p. 460-467, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria-SDA nº. 64, de 18 de março de 1994. Normas de produção, controle e emprego de tuberculina. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), seção 1, p. 4198, (23/03) 1994.
- BROOK-POLLOCK, E.; KEELING, M. Herd size and bovine tuberculosis persistence in cattle farms in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 92, n. 4, p. 360-365, 2009.
- BUCK, A. A.; GART, J. J. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. **American Journal of Epidemiology**, v. 83, n. 3, p. 586-592, 1966.

- BUDDLE, B. M. et al. Sensitivity, specificity, and confounding factors of novel serological tests used for the rapid diagnosis of bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 626-630, 2010.
- CROFTS, N.; MASKILL, W.; GUST, I. D. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays: methods of data analysis. **Journal of Virological Methods**, v. 22, p. 51-59, 1988.
- ETTER, E. et al. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. **Annales of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 61–73, 2006.
- FAIRCHILD, A. L.; OPPENHEIMER, G. M. Public health nihilism vs pragmatism: history, politics, and the control of tuberculosis. **American Journal of Public Health**, v. 88, n. 77, p. 1105-1117, 1998.
- FLETCHER, R. W.; FLETCHER, S. W. **Clinical epidemiology: the essentials**. 4 ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Phyladephia, USA. 2005. 257 p.
- FRÁGUAS, S. A. et al. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 15, n. 3, p. 117-121, 2008.
- GORMLEY, E. et al. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam1) assay. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2-4, p. 171–179, 2006.
- GREINER, M.; BÖHNING, D. Notes about determining the cut-off value in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) – Reply. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 20, n. 4, p. 307-310, 1994.
- GREINER, M. et al. Construction of an intrinsic cut-off value for the sero-epidemiological study of *Trypanosoma evansii* infection in canine population in Brazil: a new approach towards an unbiased estimation of prevalence. **Acta Tropica**, v. 56, p. 97-109, 1994.
- HUMBLET, M. F.; BOSCHIROLI, M. L.; SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. **Veterinary Research**, v. 40, n. 5, p. 50-74, 2009.
- HUMBLET, M. F. et al. Monitoring of the intra-dermal tuberculosis skin test performed by Belgian field practitioners. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 2, p. 199-207. 2011.

- JOLLEY, M. E. et al. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 113-121, 2007.
- JOLLEY, M. E.; NASIR, M. S. The use of fluorescence polarization assays for the detection of infectious diseases. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 6, n. 3, p. 235-244, 2003.
- KANTOR, I. N.; LOBUE, P. A.; THOEN, C. O. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 11, p. 1369-73, 2010.
- KOSTOVIC, M. 2013. (comunicação pessoal)
- LEPPER, A. W. D.; PEARSON, C. W.; CORNER, L. A. Anergy to tuberculin in beef cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, n. 5, p. 214-216, 1977.
- 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.
- LIN, M. et al. Modification of the *Mycobacterium bovis* extracellular protein MPB70 with fluorescein for rapid detection of specific serum antibodies by fluorescence polarization. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 4, p. 438-443, 1996.
- LIU, S. et al. A novel fusion protein based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 87, p. 212–217, 2007.
- LLOYD, S. Effect of pregnancy and lactation upon infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 4, n. 1-2, p. 153-76, 1983.
- MARASSI, C. D.; MEDEIROS, L.; LILENBAUM, W. The use of a gamma-interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, p. 119-121, 2010.
- MONAGHAN M. L. et al. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1/2, p. 111-124, 1994.
- MOSAAD, A. A. et al. Sensitive and specific diagnostic assay for detection of tuberculosis

in cattle. **Global Veterinaria**, v. 8, n. 6, p. 555-564, 2012.

MÜLLER, B. et al. Bayesian receiver operating characteristic estimation of multiple tests for diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e 8215, 8 p., 2009. doi:10.1371/journal.pone.0008215

OIE. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: **OIE terrestrial manual**, chapter 1.1.5, 2012. 18 p. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf

PLACKETT, P. et al. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, n. 1, p. 15-19, 1989.

QUEVILLON, E.-L. et al. Comparison of immune peripheral blood cells in tuberculin reactor cattle that are seropositive or seronegative for *Mycobacterium bovis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 153, n. 3-4, p. 194– 201, 2013.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 8 ed. 1994, Baillière Tindall, London. p. 834.

RANSOHOFF, D. & FEINSTEIN, A. R. Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests. **The New England Journal of Medicine**, v. 299, p. 926-930, 1978.

RHODES S. G. et al. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. **Immunology**, v. 99, p. 195-202, 2000.

RITACCO, V. et al. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 50, p. 365-367, 1991.

ROCHA, A. et al. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. **Tuberculosis**, v. 91, n. 1, p. 14-21, 2011. doi: 10.1016/j.tube.2010.10.003

SCHILLER, I. et al. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* OmpATb as a novel antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 9, p. 1314-1321, 2009.

SCHILLER, I. et al. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication.

Transboundary and Emerging Diseases, v. 57, n. 4, p. 205-220, 2010.

SLEDGE, D. G. et al. Coinfection of a cow with bovine leukemia virus and *Mycobacterium bovis*. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**, v. 21, p. 878-882, 2009.

SUGDEN, E. A.; JOLLEY, M. E.; LIN, M. **Rapid detection method of *Mycobacterium bovis* by fluorescence polarization**. US Patent, n. 006110750A, Aug. 29, 2000. 9 p.

SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; McDOWELL, S. W. J. **Bovine tuberculosis (TB): a review of cattle-to-cattle transmission, risk factors and susceptibility**. 2011. 167 p. Agri-food and Bioscience Institute. <http://www.dardni.gov.uk>

STEWART L. D. et al. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, e58374, 2013.

STRAIN S. A. J.; McNAIR J. **Bovine tuberculosis: a review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle**. 2011. Agri-food and Bioscience Institute. 45 p. <http://www.dardni.gov.uk/de/afbi-literature-review-tb-review-diagnostic-tests-cattle.pdf>

SURUJBALLI et al. Sensitive diagnosis of bovine tuberculosis in a farmed cervid herd with use of an MPB70 protein fluorescence polarization assay. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 3, p. 161-166, 2009.

SURUJBALLI, O. P. et al. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 149-157, 2002.

THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2-4, p. 339-345, 2006.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8 ed. 2008. Saunders Elsevier, Rio de Janeiro. p. 152.

TYLER, J. W. & CULLOR, J. S. Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 11, p. 1150-1558, 1989.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa. **Estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses: MDT**. 8. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2012. 72 p.

- VALENTE, L. C. M.; VALE, S. M. L. R.; BRAGA, M. J. O programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose. **Revista de Política Agrícola**, v. 18, n. 4, p. 49-66, 2009.
- VEERASAMI, M. et al. Assessment of critical parameters in blood processing for the bovine interferon-gamma ELISPOT assay to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in India. **Veterinaria Italiana**, v. 47, n. 1, p. 25-34, 2011.
- VIZARD, A. L.; ANDRESON, G. A.; GASSER, R. B. Determination of the optimum cut-off value of a diagnostic test. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, n. 1-2, p. 137-143, 1990.
- WATERS, W. R. et al. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 6, p. 648-654, 2006.
- WATERS, W. R. et al. 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.
- WEI, A.-P.; HERRON, J. N. Use of synthetic peptides as tracer antigens in fluorescence polarization immunoassays of high molecular weight analytes. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 3372-3377, 1993.
- WHELAN, C. et al. Multiplex immunoassay for the serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p. 1834-1838, 2008.
- WHIPPLE, D. L.; Bolin, C. A.; Miller, J. M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. **Journal of Veterinary Diagnostics and Investigation**, v. 8, p. 351-354, 1996.
- YERUSHALMY, J. Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. **Public Health Reports**, v. 62, n. 40, p. 1432-1449, 1947.

APÊNDICES

Tabela 1 – Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (*primers* JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), *M. bovis*, complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e *Mycobacterium tuberculosis* (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate (... p. 1 / 8...)

ID original	Tecido	Lesão	TCC	Cultura	JB	CMT	M. bovis	CMA	M tb	Experim	Comerc	A0	A72	A72-0	B0	B72	B 72-0	Delta B-A
P5 A50 A9	Linf hepático	Não	Pos	Neg		Pos	Pos	Neg	Neg	0,1157	0,0790	5,8	9,2	3,4	6,1	15,1	9,0	5,6
P5 A5 A1,2	Linf retrof medial	Não	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,1800	-0,0010	6,5	11,0	4,5	7,6	21,5	13,9	9,4
P5 A61 A1,2	Linf retrof medial	Não	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0569	-0,0878	7,1	8,0	0,9	7,5	12,7	5,2	4,1
P5 A66 A1,2	Linf retrof medial	Não	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg	0,0336	-0,0181	6,5	9,6	3,1	6,2	18,2	12,0	8,9
P5 A68 A1,2	Linf retrof medial	Não	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	0,2313	-0,0298	5,8	11,0	5,2	6,5	15,0	8,5	3,3
P5 A162 A1,2	Linf retrof medial	Não	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,1744	-0,0400	6,4	7,9	1,5	6,4	15,2	8,8	7,3
P5 A187 A1,2	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg	-0,2135	0,6534	6,9	12,9	6,0	6,7	21,1	14,4	8,4
P5 A263 A6,7	Tonsila	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,1315	-0,0265	8,5	11,5	3,0	8,0	15,2	7,2	4,2
P5 A271 A1,2	Linf retrof medial	Não	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	0,0709	0,0388	7,7	11,7	4,0	7,3	16,0	8,7	4,7
P5 A277 A1,2	Linf retrof medial	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,2080	-0,0305	5,7	7,6	1,9	5,8	14,0	8,2	6,3
P5 A288 A1,2	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg	-0,2278	0,0740	4,6	9,0	4,4	6,8	14,4	7,6	3,2
P5 A302 A4	traqueobronquial	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,1409	-0,0080	7,7	12,3	4,6	7,3	19,3	12,0	7,4
P5 A712 A3	Linf mediastínico	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,2453	0,0187	7,7	13,4	5,7	6,1	18,5	12,4	6,7
P5 A713 A6,7	Tonsila	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,2323	-0,0101	8,1	14,4	6,3	7,5	22,0	14,5	8,2
P5 A716 A8	Pulmão	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	0,1838	-0,0141	5,7	8,3	2,6	6,8	32,0	25,2	22,6
P5 A725 A1,2	Linf retrof medial	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,3088	-0,0046	6,5	12,2	5,7	6,1	22,5	16,4	10,7
P13 A05 A1,2	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Pos	Pos	Neg	Neg	0,1723	-0,0080	8,5	10,0	1,5	8,0	17,0	9,0	7,5
P13 A35 A3	Linf mediastínico	Sim	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	-0,0673	0,1550	7,7	10,0	2,3	7,0	17,0	10,0	7,7
P13 A45 A1	Linf retrof medial	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	-0,0145	-0,0175	7,0	7,0	0,0	6,8	15,0	8,2	8,2
P13 A129 A3	Linf mediastínico	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	-0,0214	1,0880	5,5	7,0	1,5	6,0	12,0	6,0	4,5
P13 A131 A4	traqueobronquial	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	-0,1452	-0,0247	7,5	10,0	2,5	8,5	20,0	11,5	9,0

Tabela 1 – Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (*primers* JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), *M. bovis*, complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e *Mycobacterium tuberculosis* (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate (... p. 2 / 8...)

ID original	Tecido	Lesão	TCC	Cultura	JB	CMT	M. bovis	CMA	M t	Experim	Comerc	A0	A72	A72-0	B0	B72	B 72-0	Delta B-A
P13 A149 AE	Linf esofágico	Sim	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg	-0,1475	0,0780	7,0	9,0	2,0	7,0	15,0	8,0	6,0
P13 A180 A1	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Neg	Pos	Neg	Neg	-0,1739	-0,0584	8,0	9,0	1,0	11,0	18,0	7,0	6,0
P13 A207 A1	Linf retrof medial	Não	Pos	Neg		Pos	Pos	Neg	Neg	0,1047	-0,0360	6,5	9,0	2,5	6,5	40,0	33,5	31,0
P13 A210 A1	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Neg	Pos	Neg	Neg	0,0293	-0,0742	11,0	15,0	4,0	8,1	30,0	21,9	17,9
P13 A242 A1	Linf retrof medial	Não	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	0,0398	-0,0296	5,5	9,0	3,5	6,0	15,0	9,0	5,5
P06 A84 Ap	Pulmão	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	-0,2154	5,0263	7,3	10,7	3,4	6,0	14,4	8,4	5,0
P06 A88 A3	Linf mediastínico	Não	Pos	Neg		Pos	Pos	Neg	Neg	0,1712	-0,0242	6,1	10,0	3,9	5,5	16,8	11,2	7,4
P06 A133 A4	traqueobronquial	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,1481	-0,0246	5,7	9,6	3,9	7,2	27,4	20,2	16,3
P2 A138 A1	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0943	-0,0516	5,9	6,9	1,0	6,1	8,9	2,8	1,8
P13 A99 A1	Linf Retrofaríngeo	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,2320	0,0125	8,5	9,0	0,5	9,5	12,0	2,5	2,0
P13 A243 A2	Linf Mediastínico	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0849	0,0252	7,5	9,0	1,5	7,5	11,0	3,5	2,0
P13 A257 A1	Linf Retrofaríngeo	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	0,1098	-0,0325	não						
P13 A270 A4	Linf Parotídeo	Sim	Pos	Neg		Pos	Pos	Neg	Neg	0,3473	0,0333	não						
P5 A40 Aa	Linf Retrofaríngeo	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,2205	-0,0432	6,7	12,1	5,4	6,5	16,5	10,0	4,6
P5 A93 Ac	Tonsila	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	0,3316	-0,0458	6,0	8,2	2,2	6,4	13,7	7,3	5,1
P5 A94 Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,4244	-0,0504	4,6	8,2	3,6	4,5	13,0	8,5	4,9
P5 A95 Aa	Linf Retrofaríngeo	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	0,0669	-0,0491	6,5	19,0	12,5	5,8	33,0	27,2	14,7
P5 A235 Ab	Linf Mediastínico	Não	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	0,3588	0,0102	7,3	9,8	2,5	7,9	16,4	8,5	6,0
P5 A251 Ad	Linf Parotídeo	Sim	Pos	Neg		Pos	Pos	Neg	Neg	0,3692	-0,0396	6,8	9,6	2,8	7,4	14,5	7,1	4,3
P5 A262 Aa	Linf Retrofaríngeo	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,7016	-0,0550	6,3	9,2	2,9	5,9	13,6	7,7	4,8
P5 A266 Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Pos	Neg		Neg	Pos	Neg	Neg	0,1021	-0,0707	6,4	11,6	5,2	6,6	16,4	9,8	4,6

Tabela 1 – Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (*primers* JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), *M. bovis*, complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e *Mycobacterium tuberculosis* (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate (... p. 3 / 8...)

ID original	Tecido	Lesão	TCC	Cultura	JB	CMT	M. bovis	CMA	M t	Experim	Comerc	A0	A72	A72-0	B0	B72	B72-0	DeltaB-A
P5A306Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,4148	-0,0570	6,0	18,5	12,5	6,2	23,2	17,0	4,5
P5A322Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,3101	-0,0684	6,2	13,6	7,4	5,4	18,5	13,1	5,7
P5A338Aa	Linf Retrofaringeo	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	0,0024	-0,0645	5,5	9,5	4,0	5,6	14,9	9,3	5,3
P5A416Aa	Linf Retrofaringeo	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg			7,7	17,5	9,8	6,5	26,3	19,8	10,0
P5A417Ab	Linf Mediastínico	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg			5,7	21,1	15,4	4,0	25,5	21,5	6,1
P5A419Ab	Linf Mediastínico	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	0,0741	-0,0298	6,9	11,9	5,0	5,9	15,0	9,1	4,1
P5A420Ab	Linf Mediastínico	Sim	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg			7,7	11,6	3,9	5,6	14,4	8,8	4,9
P5A424Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Pos	Neg		Neg	Pos	Neg	Neg	-0,0423	-0,0132	5,8	10,7	4,9	5,2	15,9	10,7	5,8
P5A739Aa	Linf Retrofaringeo	Sim	Pos	Neg		Neg	Pos	Neg	Neg	0,2324	-0,0281	6,2	8,0	1,8	4,8	11,2	6,4	4,6
P5A745Ac	Tonsila	Sim	Pos	Neg		Neg	Pos	Neg	Neg	0,6251	-0,0137	8,3	10,1	1,8	6,1	16,0	9,9	8,1
P5A1414Aa	Linf Retrofaringeo	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	0,5659	-0,0277	5,5	11,6	6,1	5,3	16,4	11,1	5,0
P7A224773Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0562	-0,0159				11,5	12,0	0,5	
P7A224776Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,1713	0,0173				11,0	11,0	0,0	
P7A224838Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,3793	0,0150				11,0	11,0	0,0	
P7A224876Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0745	-0,0044				10,0	10,0	0,0	
P7A224879Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0994	-0,0067				7,0	7,0	0,0	
P7A421243Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0334	-0,0245				8,0	8,0	0,0	
P7A428033Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0334	-0,0236				8,0	8,0	0,0	
P7A428047Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0822	-0,0146				7,5	9,0	1,5	
P7A428049Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0459	-0,0081				8,0	11,0	3,0	
P7A428054Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0076	-0,0048				9,0	10,5	1,5	
P7A428059Aa	Linf Retrofaringeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,1022	-0,0091				11,0	12,0	1,0	

Tabela 1 – Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (*primers* JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), *M. bovis*, complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e *Mycobacterium tuberculosis* (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate (... p. 4 / 8...)

ID original	Tecido	Lesão	TCC	Cultura	JB	CMT	M. bovis	CMA	M t	Experim	Comerc	A0	A72	A72-0	B0	B72	B72-0
P7A428065Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0067	0,0367				8,0	8,5	0,5
P7A428077Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0745	-0,0054				9,0	9,0	0,0
P7A428081Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0220	-0,0177				9,0	9,0	0,0
P7A428082Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,1242	0,0146				12,0	12,0	0,0
P7A428084Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0124	0,0019				9,0	9,0	0,0
P7A428094Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,1223	-0,0140				6,0	7,5	1,5
P7A428118Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,1223	-0,0120				7,0	7,5	0,5
P7A428139Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0898	0,0730				7,0	8,0	1,0
P7A428140Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0373	-0,0152				9,5	8,5	-1,0
P7A428151Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0545	-0,0048				9,0	10,0	1,0
P7A428170Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0936	-0,0206				8,0	10,5	2,5
P7A428175Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-0,1328	-0,0236				9,5	10,0	0,5
P7A428183Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0936	-0,0175				5,0	6,0	1,0
P7A428218Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0363	-0,0120				5,5	6,5	1,0
P7A755128Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0090	-0,0224				5,5	6,5	1,0
P7A224745Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0129	-0,0048				9,0	9,5	0,5
P7A224755Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0266	0,0418				11,0	8,5	-2,5
P7A224757Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0678	0,0114				7,5	8,0	0,5
P7A224843Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0420	-0,0083				11,0	15,0	4,0
P7A224849Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg	0,1219	0,0144				9,0	10,0	1,0
P7A224881Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	0,0439	-0,0161				7,0	6,0	-1,0
P7A400249Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0432	-0,0105				9,5	10,0	0,5

Tabela 1 – Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (*primers* JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), *M. bovis*, complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e *Mycobacterium tuberculosis* (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate (... p. 5 / 8...)

ID original	Tecido	Lesão	TCC	Cultura	JB	CMT	M. bovis	CMA	M t	Experim	Comerc	A0	A72	A72-0	B0	B72	B72-0
P7A421110Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0382	-0,0036				7,0	10,0	3,0
P7A421119Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0392	-0,0204				6,5	6,5	0,0
P7A421257Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0239	0,0021				10,5	10,0	-0,5
P7A428046Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,1242	-0,0208				11,0	9,5	-1,5
P7A428051Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	0,0134	-0,0081				7,5	7,0	-0,5
P7A428122Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0554	-0,0046				7,0	7,5	0,5
P7A428124Ab	Linf Mediastínico	Sim	Neg	Pos		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0850	-0,0232				7,0	8,5	1,5
P7A428135Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-0,1309	-0,0107				9,0	8,5	-0,5
P7A428136Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0411	-0,0019				10,0	11,0	1,0
P7A428152Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0325	0,0013				8,5	9,0	0,5
P7A428206Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0860	-0,0144				7,0	11,0	4,0
P7A428245Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,0969	-0,0150				8,0	8,0	0,0
P7A428266Aa	Linf Retrofaríngeo	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0121	-0,0126				9,0	9,5	0,5
P7A755062Aa	Linf Retrofaríngeo	Sim	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	-0,2002	-0,0048				6,5	6,5	0,0
P1A38A	Linf Medias Caudal	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,2406	-0,0069				6,8	16,0	9,2
P1A34A	Linf Medias Caudal	Não	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg						não		
P1A69A	Linf Medias Caudal	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,548	-0,0259				6,3	10,0	3,7
P1ASemrincoA	Linf Medias Caudal	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg						não		
P1A2008A	Linf Medias Caudal	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,1716	0,0187				6,3	16,0	9,7
P1A09A	Linf Medias Caudal	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,5917	-0,0369				6,0	14,0	8,0
P1A78A	Linf Medias Caudal	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,2650	0,0143				6,4	9,9	3,5
P1A14A	Linf Medias Caudal	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,4469	-0,0287				6,3	7,0	0,7

Tabela 1 – Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (*primers* JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), *M. bovis*, complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e *Mycobacterium tuberculosis* (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate (... p. 6 / 8...)

ID original	Tecido	Lesão	TCC	Cultura	JB	CMT	M. bo	CMA	M t	Experim	Comerc	A0	A72	A72-0	B0	B72	B72-0	DeltaB-A
P1A30A	Linf retrof medial	Sim	Pos	Pos	s/ DNA	Neg	Neg	Neg	Neg	-0,3820	-0,0312				5,2	11,0	5,8	
P1A476A	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg	-0,1611	-0,0174				10,2	15,0	4,8	
P1A35A	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,1244	-0,0041				4,6	7,5	2,9	
P1A87A	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	-0,6226	-0,0284				6,2	11,0	4,8	
P1AA17A	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg						não			
P1A2012A	Linf retrof medial	Sim	Pos	Neg		Pos	Neg	Neg	Neg	-0,1363	-0,0399				5,6	9,0	3,4	
P18A3291A	Linf. Traqueo	Sim	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	1,0614	0,0147				não			
P18A2504A	Linf. Mediastinico	Sim	Pos	Pos	s/ DNA	Neg	Neg	Neg	Neg	0,3249	0,0077				não			
P18A3284A	Linf. Retrof	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	1,0384	-0,0035	6,2	10,0	3,8	7,3	15,0	7,7	3,9
P18A1771A	Linf. Retrof	Sim	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	0,8510	0,9613	6,0	9,0	3,0	5,5	10,4	4,9	1,9
P18A3293A	Linf retrof medial	Não	Pos	Pos	s/ DNA	Neg	Neg	Neg	Neg	0,7088	-0,0190	5,9	7,0	1,1	6,4	10,0	3,6	2,5
P18A1767A	Linf retrof medial	Não	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,1876	0,1097	5,3	7,0	1,7	6,4	9,5	3,1	1,4
P18A3278A	Linf Medias Caudal	Sim	Pos	Pos	s/ DNA	Neg	Neg	Neg	Neg	0,6887	0,1412	6,3	10,7	4,4	5,8	13,7	7,9	3,5
P18A3289A	Linf. Retrof	Sim	Pos	Pos	s/ DNA	Neg	Neg	Neg	Neg	1,0672	5,7171	4,5	6,7	2,2	4,8	11,0	6,2	4,0
P18A3296A	Linf. Mediastinico	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,3591	-0,0031	5,3	7,2	1,9	5,5	9,0	3,5	1,6
P18A4019A	Linf Medias Caudal	Sim	Pos	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,5178	-0,0279	não						
P2A108A	Sem identi.	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,3359	0,0526	6,7	7,4	0,7	6,7	10,5	3,8	3,1
P2A115A	Sem identi.	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,1764	0,0295	6,0	7,1	1,1	6,5	8,8	2,3	1,2
P2A135A	Sem identi.	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0943	-0,0516	6,2	9,9	3,7	7,1	10,8	3,7	0,0
P2A145A	Sem identi.	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,1177	-0,0099	6,8	9,6	2,8	7,0	9,4	2,4	-0,4
P2A153A	Sem identi.	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,0637	0,0768	5,6	8,6	3,0	6,5	8,1	1,6	-1,4
P2A183A	Sem identi.	Não	Neg	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	0,2763	0,0338	6,5	7,9	1,4	6,7	8,6	1,9	0,5
P254		Não	Neg			Pos	Pos	Neg	Neg	0,7689	-0,0584	7,8	8,7	0,9	7,0	9,1	2,1	1,2
P282		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,5154	0,4087	9,1	10,9	1,8	8,5	11,7	3,2	1,4

Tabela 1 – Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (*primers* JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), *M. bovis*, complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e *Mycobacterium tuberculosis* (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate (... p. 7 / 8...)

ID original	Tecido	Lesão	TCC	Cultura	JB	CMT	M.bo	CMA	M t	Experim	Comerc	A0	A72	A72-0	B0	B72	B72-0	DeltaB-A
P296		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,1341	0,0124	5,6	6,0	0,4	6,2	7,6	1,4	1,0
P298		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,7513	0,4096	7,3	8,9	1,6	7,9	9,0	1,1	-0,5
P2111		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,1787	-0,0499	6,2	9,6	3,4	7,0	9,9	2,9	-0,5
P2113		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,2785	-0,0251	5,1	5,4	0,3	5,3	6,7	1,4	1,1
P2124		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,0919	-0,0511	7,2	9,6	2,4	6,8	8,3	1,5	-0,9
P2189		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,2913	-0,0113	7,9	12,2	4,3	6,9	13,1	6,2	1,9
P102		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,4692	0,4209	7,0	8,5	1,5	7,5	7,6	0,1	-1,4
P10427		Não	Neg							0,2370	0,9502	6,5	6,5	0,0	6,5	6,7	0,2	0,2
P10484		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,1990	0,2566	6,6	9,0	2,4	7,8	8,2	0,4	-2,0
P10539		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,1082	0,0586	7,0	8,6	1,6	7,6	8,6	1,0	-0,6
P10605		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,0022	0,2314	6,0	7,6	1,6	6,7	8,1	1,4	-0,2
P10607		Não	Neg				Pos	Neg	Neg	0,7313	0,0218	8,8	14,5	5,7	9,0	13,0	4,0	-1,7
P10627		Não	Neg			Pos	Pos	Neg	Neg	0,1305	-0,0391	7,2	7,2	0,0	7,2	7,4	0,2	0,2
P10204		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,3022	0,0927	6,0	6,7	0,7	7,4	7,5	0,1	-0,6
P10478		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,3040	0,6046	5,6	5,7	0,1	6,3	6,4	0,1	0,0
P10648		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,5700	0,0449	6,7	10,0	3,3	8,0	10,5	2,5	-0,8
P10800		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,3698	0,2570	5,9	9,7	3,8	7,3	10,7	3,4	-0,4
P10178			Neg							0,2089	0,5850	6,0	6,2	0,2	6,9	7,3	0,4	0,2
P10426			Neg							0,1048	-0,0189	7,2	7,6	0,4	6,7	7,2	0,5	0,1

Tabela 1 – Resultados de lesão, TCC/TCS, cultura, PCR em cultura (*primers* JB), e em tempo real diretamente de tecidos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), *M. bovis*, complexo *Mycobacterium avium* (CMA) e *Mycobacterium tuberculosis* (M tb) e ELISAs experimental e comercial dos 160 animais acompanhados ao abate (... p. 8 / 8.)

ID original	Tecido	Lesão	TCC	Cultura	JB	CMT	M.bo	CMA	M t	Experim	Comerc	A0	A72	A72-0	B0	B72	B72-0	DeltaB-A
P128		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,2729	0,6014	5,7	6,5	0,8	6,8	8,0	1,2	0,4
P1250		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg			5,5	7,8	2,3	7,1	7,5	0,4	-1,9
P12104		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg			8,2	9,0	0,8	8,6	8,8	0,2	-0,6
P12122		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,3189	0,6721	6,0	6,2	0,2	7,2	7,2	0,0	-0,2
P121051		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,1541	0,7479	6,2	9,2	3,0	8,2	8,8	0,6	-2,4
P14121AZ		Não	Neg							-0,0423	-0,0154	6,1	8,2	2,1	7,1	9,0	1,9	-0,2
P1808		Não	Pos			Neg	Neg	Neg	Neg			6,1	7,8	1,7	7,4	12,7	5,3	3,6
P181742		Não	Neg			Neg	Neg	Neg	Neg	0,723	1,5563	6,5	7,2	0,7	7,5	9,9	1,0	1,0
P181757		Sim	Neg			Pos	Pos	Neg	Neg	0,690	0,3346	6,8	11,1	4,3	7,1	8,9	1,8	0,0

Tabela 2 – TCC versus ELISA experimental: resultados das análises estatísticas

comparacao	rebanho	a	b	c	d	SENS	ESPE	VPP	VPN	CGT	qui	prob	ODSRACOMO	LI	LS	KAPA	LIK	LSK
1TCC-EXPERIM	01: 1	9	9	31	78	22.50	89.66	50.00	71.56	68.50	3.33	0.068	2.516	0.913	6.931	0.1428	-0.0246	0.3101
1TCC-EXPERIM	02: 2	.	17	.	57	.	77.03
1TCC-EXPERIM	03: 3	.	6	.	79	.	92.94
1TCC-EXPERIM	04: 4	.	7	.	103	.	93.64
1TCC-EXPERIM	05: 5	10	64	23	77	30.30	54.61	13.51	77.00	50.00	2.49	0.115	0.523	0.232	1.179	-0.1022	-0.2242	0.0198
1TCC-EXPERIM	06: 6	0	5	3	3	0.00	37.50	0.00	50.00	27.27	3.44	0.064	.	.	.	-0.5172	-0.9166	-0.1178
1TCC-EXPERIM	07: 7	0	5	3	198	0.00	97.54	0.00	98.51	96.12	0.08	0.783	.	.	.	-0.0185	-0.0330	-0.0040
1TCC-EXPERIM	08: 9	.	25	.	127	.	83.55
1TCC-EXPERIM	09:10	.	54	.	122	.	69.32
1TCC-EXPERIM	10:11	.	42	.	203	.	82.86
1TCC-EXPERIM	11:12	.	57	.	178	.	75.74
1TCC-EXPERIM	12:13	1	43	13	265	7.14	86.04	2.27	95.32	82.61	0.53	0.468	0.474	0.060	3.717	-0.0337	-0.1039	0.0365
1TCC-EXPERIM	13:14	.	7	.	55	.	88.71
1TCC-EXPERIM	14:15	.	11	.	313	.	96.60
1TCC-EXPERIM	15:16	.	7	.	117	.	94.35
1TCC-EXPERIM	16:17	.	.	.	19
1TCC-EXPERIM	17:18	14	53	7	26	66.67	32.91	20.90	78.79	40.00	0.00	0.971	0.981	0.353	2.725	-0.0023	-0.1280	0.1233
1TCC-EXPERIM	18:19	.	1	.	11	.	91.67
1TCC-EXPERIM	19:20	0	4	1	30	0.00	88.24	0.00	96.77	85.71	0.13	0.716	.	.	.	-0.0479	-0.1255	0.0297
1TCC-EXPERIM	20:21	0	30	3	58	0.00	65.91	0.00	95.08	63.74	1.53	0.217	.	.	.	-0.0638	-0.1322	0.0046
1TCC-EXPERIM	21:24	.	3	.	16	.	84.21
1TCC-EXPERIM	22:99	34	450	84	2135	28.81	82.59	7.02	96.21	80.24	9.99	0.002	1.920	1.273	2.897	0.0460	0.0120	0.0800

Legenda: TCC=Teste cervical comparativo; EXPERIM=ELISA experimental; COM=ELISA comercial; a, b, c, d = Tabela de contingência 2x2; Sens=sensibilidade; Esp=Especificidade; VPP=Valor preditivo positivo; VPN=Valor preditivo negativo; CGT= Concordância geral; qui= teste de McNemar (χ^2); prob= P do χ^2 ; ODSRACOMO=razão de casualidade; LI= limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS= limite superior do intervalo de confiança 95%; LIK e LSK= idem de kappa

Tabela 3 – TCC versus ELISA comercial: resultados das análises estatísticas

comparacao	rebanho	a	b	c	d	SENS	ESPE	VPP	VPN	CGT	qui	prob	ODSRACOMO	LI	LS	KAPA	LIK	LSK	
2TCC-COM	01: 1	5	3	35	84	12.50	96.55	62.50	70.59	70.08	3.80	0.051	4.000	0.906	17.654	0.1155	-0.0218	0.2528	
2TCC-COM	02: 2	.	3	.	71	.	95.95
2TCC-COM	03: 3	.	19	.	65	.	77.38
2TCC-COM	04: 4	.	.	.	110
2TCC-COM	05: 5	1	3	32	138	3.03	97.87	25.00	81.18	79.89	0.10	0.755	1.438	0.145	14.275	0.0136	-0.0815	0.1087	
2TCC-COM	06: 6	1	2	2	6	33.33	75.00	33.33	75.00	63.64	0.08	0.782	1.500	0.084	26.855	0.0833	-0.5278	0.6944	
2TCC-COM	07: 7	0	1	3	202	0.00	99.51	0.00	98.54	98.06	0.01	0.903	.	.	.	-0.0073	-0.0183	0.0037	
2TCC-COM	08: 9	.	35	.	117	.	76.97
2TCC-COM	09:10	.	48	.	128	.	72.73
2TCC-COM	10:11	.	21	.	224	.	91.43
2TCC-COM	11:12	.	146	.	89	.	37.87
2TCC-COM	12:13	1	20	13	288	7.14	93.51	4.76	95.68	89.75	0.01	0.923	1.108	0.138	8.901	0.0052	-0.1059	0.1164	
2TCC-COM	13:14	.	.	.	62
2TCC-COM	14:15	.	20	.	304	.	93.83
2TCC-COM	15:16	.	4	.	120	.	96.77
2TCC-COM	16:17	.	.	.	19
2TCC-COM	17:18	3	20	18	59	14.29	74.68	13.04	76.62	62.00	1.14	0.286	0.492	0.131	1.847	-0.1066	-0.2773	0.0641	
2TCC-COM	18:19	.	1	.	11	.	91.67
2TCC-COM	19:20	0	1	1	33	0.00	97.06	0.00	97.06	94.29	0.03	0.862	.	.	.	-0.0294	-0.0702	0.0113	
2TCC-COM	20:21	.	.	3	88	.	.	.	96.70
2TCC-COM	21:24	.	5	.	14	.	73.68
2TCC-COM	22:99	11	352	107	2232	9.32	86.38	3.03	95.43	83.01	1.79	0.180	0.652	0.347	1.225	-0.0216	-0.0489	0.0057	

Legenda: TCC=Teste cervical comparativo; EXPERIM=ELISA experimental; COM=ELISA comercial; a, b, c, d = Tabela de contingência 2x2; Sens=sensibilidade; Esp=Especificidade; VPP=Valor preditivo positivo; VPN=Valor preditivo negativo; CGT= Concordância geral; qui= teste de McNemar (χ^2); prob= P do χ^2 ; ODSRACOMO=razão de casualidade; LI= limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS= limite superior do intervalo de confiança 95%; LIK e LSK= idem de kappa

Tabela 4 – ELISA comercial versus experimental: resultados das análises estatísticas

comparacao	rebanho	a	b	c	d	SENS	ESPE	VPP	VPN	CGT	qui	prob	ODSRACOMO	LI	LS	KAPPA	LIK	LSK	
3COM-EXPERIM	01:1	2	16	6	103	25.00	86.55	11.11	94.50	82.68	0.82	0.364	2.146	0.398	11.568	0.0730	-0.1218	0.2678	
3COM-EXPERIM	02:2	2	15	1	56	66.67	78.87	11.76	98.25	78.38	3.37	0.066	7.467	0.633	88.024	0.1408	-0.0717	0.3533	
3COM-EXPERIM	03:3	0	6	19	59	0.00	90.77	0.00	75.64	70.24	1.89	0.169	.	.	.	-0.1218	-0.2010	-0.0426	
3COM-EXPERIM	04:4	.	7	.	103	.	93.64
3COM-EXPERIM	05:5	0	74	4	96	0.00	56.47	0.00	96.00	55.17	3.03	0.082	.	.	.	-0.0456	-0.0894	-0.0018	
3COM-EXPERIM	06:6	2	3	1	5	66.67	62.50	40.00	83.33	63.64	0.75	0.387	3.333	0.204	54.532	0.2414	-0.2983	0.7811	
3COM-EXPERIM	07:7	0	5	1	200	0.00	97.56	0.00	99.50	97.09	0.02	0.874	.	.	.	-0.0082	-0.0216	0.0053	
3COM-EXPERIM	08:9	8	17	27	100	22.86	85.47	32.00	78.74	71.05	1.36	0.244	1.743	0.680	4.470	0.0925	-0.0765	0.2616	
3COM-EXPERIM	09:10	17	37	31	91	35.42	71.09	31.48	74.59	61.36	0.70	0.404	1.349	0.667	2.728	0.0627	-0.0878	0.2132	
3COM-EXPERIM	10:11	4	38	17	186	19.05	83.04	9.52	91.63	77.55	0.06	0.809	1.152	0.367	3.614	0.0143	-0.1061	0.1348	
3COM-EXPERIM	11:12	50	7	96	82	34.25	92.13	87.72	46.07	56.17	20.95	0.000	6.101	2.623	14.190	0.2207	0.1348	0.3067	
3COM-EXPERIM	12:13	4	40	17	261	19.05	86.71	9.09	93.88	82.30	0.55	0.458	1.535	0.492	4.795	0.0382	-0.0762	0.1525	
3COM-EXPERIM	13:14	.	7	.	55	.	88.71
3COM-EXPERIM	14:15	1	10	19	294	5.00	96.71	9.09	93.93	91.05	0.17	0.682	1.547	0.188	12.729	0.0217	-0.1016	0.1449	
3COM-EXPERIM	15:16	1	6	3	114	25.00	95.00	14.29	97.44	92.74	2.91	0.088	6.333	0.570	70.337	0.1468	-0.1663	0.4598	
3COM-EXPERIM	16:17	.	.	.	19
3COM-EXPERIM	17:18	17	50	6	27	73.91	35.06	25.37	81.82	44.00	0.65	0.422	1.530	0.540	4.336	0.0537	-0.0726	0.1800	
3COM-EXPERIM	18:19	0	1	1	10	0.00	90.91	0.00	90.91	83.33	0.10	0.753	.	.	.	-0.0909	-0.2164	0.0346	
3COM-EXPERIM	19:20	0	4	1	30	0.00	88.24	0.00	96.77	85.71	0.13	0.716	.	.	.	-0.0479	-0.1255	0.0297	
3COM-EXPERIM	20:21	.	30	.	61	.	67.03
3COM-EXPERIM	21:24	2	1	3	13	40.00	92.86	66.67	81.25	78.95	2.99	0.084	8.667	0.577	130.111	0.3770	-0.1031	0.8572	
3COM-EXPERIM	22:99	110	374	253	1965	30.30	84.01	22.73	88.59	76.79	43.78	0.000	2.284	1.780	2.932	0.1255	0.0821	0.1688	

Legenda: TCC=Teste cervical comparativo; EXPERIM=ELISA experimental; COM=ELISA comercial; a, b, c, d = Tabela de contingência 2x2; Sens=sensibilidade; Esp=Especificidade; VPP=Valor preditivo positivo; VPN=Valor preditivo negativo; CGT= Concordância geral; qui= teste de McNemar (χ^2); prob= P do χ^2 ; ODSRACOMO=razão de casualidade; LI= limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS= limite superior do intervalo de confiança 95%; LIK e LSK= idem de kappa

Tabela 5 – TCC versus ELISA comercial, versus experimental e experimental versus comercial por categoria: resultados das análises estatísticas

comparacao	rebanho	a	b	c	d	SENS	ESPE	VPP	VPN	CGT	qui	prob	ODSRACOMO	LI	LS	KAPPA	LIK	LSK
1TCC-EXPERIM	01: 1	.	15	.	231	.	93.90			
1TCC-EXPERIM	02: 2	.	6	.	98	.	94.23			
1TCC-EXPERIM	03: 3	.	78	.	643	.	89.18			
1TCC-EXPERIM	04: 4	.	118	.	355	.	75.05			
1TCC-EXPERIM	05: 6	34	233	84	808	28.81	77.62	12.73	90.58	72.65	2.47	0.116	1.404	0.918	2.145	0.0412	-0.0138	0.0962
1TCC-EXPERIM	06:99	34	450	84	2135	28.81	82.59	7.02	96.21	80.24	9.99	0.002	1.920	1.273	2.897	0.0460	0.0120	0.0800
2TCC-COM	01: 1	.	5	.	241	.	97.97			
2TCC-COM	02: 2	.	19	.	84	.	81.55			
2TCC-COM	03: 3	.	76	.	645	.	89.46			
2TCC-COM	04: 4	.	194	.	279	.	58.99			
2TCC-COM	05: 6	11	58	107	983	9.32	94.43	15.94	90.18	85.76	2.66	0.103	1.742	0.887	3.421	0.0460	-0.0202	0.1121
2TCC-COM	06:99	11	352	107	2232	9.32	86.38	3.03	95.43	83.01	1.79	0.180	0.652	0.347	1.225	-0.0216	-0.0489	0.0057
3COM-EXPERIM	01: 1	1	14	4	227	20.00	94.19	6.67	98.27	92.68	1.72	0.189	4.054	0.424	38.722	0.0717	-0.1095	0.2529
3COM-EXPERIM	02: 2	0	6	19	78	0.00	92.86	0.00	80.41	75.73	1.44	0.230	.	.	.	-0.0971	-0.1597	-0.0346
3COM-EXPERIM	03: 3	13	65	63	580	17.11	89.92	16.67	90.20	82.25	3.48	0.062	1.841	0.961	3.526	0.0695	-0.0169	0.1558
3COM-EXPERIM	04: 4	67	51	127	228	34.54	81.72	56.78	64.23	62.37	16.15	0.000	2.358	1.543	3.604	0.1729	0.0873	0.2584
3COM-EXPERIM	05: 6	29	238	40	852	42.03	78.17	10.86	95.52	76.01	14.93	0.000	2.595	1.576	4.275	0.0862	0.0332	0.1391
3COM-EXPERIM	06:99	110	374	253	1965	30.30	84.01	22.73	88.59	76.79	43.78	0.000	2.284	1.780	2.932	0.1255	0.0821	0.1688

Legenda: TCC=Teste cervical comparativo; EXPERIM=ELISA experimental; COM=ELISA comercial; a, b, c, d = Tabela de contingência 2x2; Sens=sensibilidade; Esp=Especificidade; VPP=Valor preditivo positivo; VPN=Valor preditivo negativo; CGT= Concordância geral; qui= teste de McNemar (χ^2); prob= P do χ^2 ; ODSRACOMO=razão de casualidade; LI= limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS= limite superior do intervalo de confiança 95%; LIK e LSK= idem de kappa