

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA**  
**AGROPECUÁRIA**

**INDIANA GOMES DA SILVA**

**APLICAÇÃO DE UM KIT ELISA INDIRETO COMERCIAL PARA O**  
**DIAGNÓSTICO DE MYCOBACTERIUM BOVIS DE SOROS DE**  
**BOVINOS ABATIDOS NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**JULHO – 2023**

**INDIANA GOMES DA SILVA**

**APLICAÇÃO DE UM KIT ELISA INDIRETO COMERCIAL PARA O  
DIAGNÓSTICO DE MYCOBACTERIUM BOVIS DE SOROS DE  
BOVINOS ABATIDOS NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Trabalho de defesa submetido ao colegiado de Pós-graduação de Medicina Veterinária do Programa de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito para conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**JULHO – 2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586a

Silva, Indiana Gomes da.

Aplicação de um kit elisa indireto comercial para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* de soros de bovinos abatidos no Recôncavo da Bahia / Indiana Gomes da Silva.\_ Cruz das Almas, BA, 2023.

45f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária.

Orientador: Prof. PhD. Robson Bahia Cerqueira.

1.Bovino – Doenças. 2.Bovino – Tuberculose em bovino – Diagnostico. 3.Sorologia veterinária – Analise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.2

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Samento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

INDIANA GOMES DA SILVA

**APLICAÇÃO DE UM KIT ELISA INDIRETO COMERCIAL PARA O  
DIAGNÓSTICO DE MYCOBACTERIUM BOVIS DE SOROS DE  
BOVINOS ABATIDOS NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Cruz das Almas, 07 de junho de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Ph.D. Robson Cerqueira Bahia  
Orientador  
UFRB



---

Prof. Ana Karina da Silva Cavalcante  
Membro interno  
UFRB



---

Prof. Marcus Paulo de Matos Maurino  
Membro externo  
UFRB

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram ao longo desta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me proporcionado determinação, dedicação e iluminado meus caminhos sempre, é com Ele que me apego em dias difíceis e entrego em Suas mãos a direção da minha vida.

Aos meus pais, Erasmo (em memória) e Joselina que sempre me apoiaram e incentivaram, que acreditaram no meu potencial e busca por sempre ir além.

A minha família, a família Carmo Queiroz, em especial ao meu irmão Hudson e ao meu noivo Junior que me incentivam, confiam no meu potencial e me fazem querer ir sempre em busca do meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos/as que se fizeram presente e sempre vibram com cada conquista e cada passo almejado. Em especial a Andréa e Hemmilly que estiveram presentes ainda mais nessa caminhada.

Aos parceiros da Embrapa Gado de Corte, em especial a Flávio e Lenita. que foram muito receptivos e acolhedores durante minha jornada no experimento e auxílio após.

A todo corpo docente da UFRB que são excelentes profissionais e educadores, à eles todo meu carinho e respeito. Em especial ao meu orientador Professor Dr. Robson Cerqueira que me concedeu a oportunidade de conviver e aprender durante estes dois anos com ele, sempre com maestria em seus ensinamentos. E a Professora Ana Karina que me incentivou de diversas formas, minha eterna gratidão, o mundo precisa de mais incentivadores como a senhora.

Aos meus filhos Pets: Heinz (em memória), Berenice e Sherlock que enchem minha caminhada de afeto e amor, deixando-a mais leve em todos os âmbitos da vida.

A FAPESB, pelo suporte financeiro; à ADAB, pela colaboração na obtenção das amostras e ao programa de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária (UFRB), pelo suporte educacional.

## EPÍGRAFE

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos.”

Paulo Beleki

SILVA, Indiana Gomes da., **Aplicação de um kit ELISA indireto comercial para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* de soros de bovinos abatidos no Recôncavo da Bahia**

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

## RESUMO

A tuberculose bovina é uma enfermidade crônica, cursa de forma subclínica; tem como agente causador a bactéria *Mycobacterium bovis*, que age por meio da formação de granulomas e pode se alojar em qualquer órgão ou tecido, com predileção pelo trato respiratório, sua principal via de infecção. Por se tratar de uma zoonose instituiu-se um Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose através do teste de tuberculinização intradérmica e controle por meio do abate sanitário em animais positivos. O presente trabalho teve como objetivo realizar a identificação de *Mycobacterium bovis* em amostras de soro fornecidos pelo órgão de fiscalização da Bahia da região do Recôncavo da Bahia, por meio do teste iELISA indireto, que conta com uma chimera recombinante de proteínas peptídicas específicas: MPB70, MPB83 e ESAT de *Mycobacterium bovis*, desenvolvido pela EMBRAPA através da detecção de anticorpos, confirmando ou não a enfermidade no animal. Das 430 amostras de soro avaliadas, 30 foram consideradas positivas, ressalta-se que na leitura das placas o controle positivo foi 100% confirmado, o que por sua vez, classifica o teste em eficaz, com rápida detecção, o que facilita sua inserção no mercado bovino para melhor controle e erradicação da doença. Pois visa, reduzir as perdas e reduzir os problemas correlacionados à saúde.

Palavras-chave: Rebanho; Diagnóstico; Kit Chimera indireto.



SILVA, Indiana Gomes da., **Application of a commercial indirect ELISA kit for the diagnosis of Mycobacterium bovis in sera from cattle slaughtered in the Recôncavo da Bahia**

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

### **ABSTRACT**

Bovine tuberculosis is a chronic disease, with a subclinical course; Its causative agent is the bacterium Mycobacterium bovis, which acts through the formation of granulomas and can lodge in any organ or tissue, with a predilection for the respiratory tract, its main route of infection. As it is a zoonosis, a National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis is instituted through the intradermal tuberculinization test and control through the sanitary slaughter of positive animals. The objective of this work was to carry out the identification of Mycobacterium bovis in serum samples provided by the inspection body of Bahia in the Recôncavo da Bahia region, through the indirect iELISA test, which has a recombinant chimera of specific peptide proteins: MPB70, MPB83 and ESAT of Mycobacterium bovis, developed by EMBRAPA through the detection of antibodies, confirming or not the disease in the animal. Of the 430 serum samples evaluated, 30 were considered positive, it is noteworthy that in the reading of the plates the positive control was 100% confirmed, which in turn classifies the test as effective, with rapid detection, which facilitates its insertion in the bovine market for better control and eradication of the disease. It aims to reduce losses and reduce health related problems.

**Keywords:** Herd of cattle; Diagnosis; Indirect Chimera kit.

## LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

	Página
Quadro 1 – Placa de ELISA com 96 poços – aplicação horizontal .....	31
Quadro 2 – Placa de ELISA com 96 poços – aplicação vertical.....	32
Gráfico 1 – Resultados das amostras Kit Chimera após utilizar o cutt off 0,483 como média de classificação .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAB – Agência de Defesa Agropecuária da Bahia

BA – Bahia

BAAR – Bacilos Álcool Ácidos Resistentes

BCG – Bacilo Clamette Guerin

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ESAT-6 – Alvo Antigênico Secretado Precocemente

h – Horas

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido Sulfúrico

iELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireta

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

*M. bovis* – *Mycobacterium bovis*

MBTC – Complexo *Mycobacterium Tuberculosis*

mm – Milímetro

ml – mililitro

MPB70 – Proteína Altamente Homóloga 70

MPB83 – Proteína Altamente Homóloga 83

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

N – Número

nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Salina Tamponada com Fosfato

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose.

PPD – Derivado Proteico Purificado

Th1 – T helper 1 (auxiliar)

X – Vezes

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

$\leq$  – menor igual que

$>$  – maior que

$^{\circ}\text{C}$  – grau Célsius

$\mu\text{l}$  – microlitro

$\mu\text{m}$  – micrômetro

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 GERAL .....	17
2.2 ESPECÍFICO .....	17
<b>3 REVISÃO .....</b>	<b>18</b>
3.1 DEFINIÇÃO .....	18
3.2 HISTÓRIA .....	18
3.3 EPIDEMIOLOGIA .....	19
3.4 ETIOLOGIA .....	20
3.5 SINTOMAS/SINAIS CLÍNICOS .....	20
3.6 TRANSMISSÃO .....	21
3.7 PATOGENIA .....	22
3.8 ESTRUTURA DO GRANULOMA .....	22
3.9 DIAGNÓSTICO .....	23
3.9.1 Clínico .....	23
3.9.2 Laboratorial .....	24
3.10 TRATAMENTO .....	25
3.11 PREVENÇÃO .....	26
3.12 IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA .....	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDO .....	28
4.2 DESENHO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM .....	28
4.3 PADRONIZAÇÃO DO TESTE CHIMERA .....	28
4.4 PROTOCOLO DA EMBRAPA .....	30
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	35
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma patologia crônica e infecciosa, identificada como uma doença bacteriana que tem como agente causador o *Mycobacterium bovis* (ABAKAR et al., 2017); por acometer também os humanos é dita uma zoonose, que cursa com importante impacto econômico e na saúde pública (BANOS et al., 2017; LI et al., 2017).

A doença cursa com a formação de lesões nodulares, também chamados de granulomas, que podem se alojar em qualquer órgão ou tecido (SOUZA et al., 2014). A principal via de disseminação é a respiratória, desta forma a propagação da doença se dá principalmente por: secreção nasal; mas, também pode acontecer por meio de urina, fezes, leite, secreção vaginal, uterinas e pelo sêmen (GHEBREMARIAM et al., 2018).

Os animais infectados evoluem com perda progressiva de peso e diminuição da produção leiteira (MEMON et al., 2019), além de alta mortalidade e condenação de carcaça em frigoríficos (FIRDESSA et al., 2012); se torna difícil sua identificação em decorrência do longo período de incubação. Desta forma, a tuberculose representa significativas perdas econômicas para o país que acomete (SOUZA et al., 2014).

A transmissão para o ser humano, se dá por meio da ingestão de produtos não pasteurizados (GUMI, 2012); recomenda-se pasteurizar o leite na temperatura de 35-70°C (MC CULLOCH et al., 2017). Nos frigoríficos se faz essencial a presença do médico veterinário para vistoriar estes produtos e fazer o controle de qualidade, assegurando assim os produtos disponibilizados para o consumo humano, com o objetivo de proteger a saúde animal e o meio ambiente (BRASIL, 2019).

O diagnóstico da tuberculose segue o estabelecido pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com o uso de testes alérgicos e de tuberculinização intradérmica: os positivos vão para o abate no frigorífico e é realizado o controle sanitário (BRASIL, 2006).

A cultura bacteriana é considerada o exame de padrão ouro, pois, identifica o patógeno por meio do isolamento do patógeno (DIALLO et al., 2016). Outros métodos como: PCR (SOUZA et al., 2012) e testes sorológicos a base de resposta imune podem ser utilizados e aumentam a cobertura diagnóstica (CALDER et al., 2016).

O kit Chimera iELISA desenvolvido pela Embrapa, para identificação de *Mycobacterium bovis*, dispõe de 100% sensibilidade e 92,5% especificidade, denota com o uso da quimera recombinante de ESAT-6, MP70 e MPB83 como antígeno que complementa o teste e identifica os positivos no rebanho (SOUZA et al., 2019). Portanto, com base nesta conjuntura, propõe-se com este trabalho um diagnóstico rápido e seguro fundamentado na identificação da tuberculose com o auxílio da técnica molecular: Chimera iELISA.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Detectar soropositividade por *Mycobacterium bovis* através de um kit ELISA indireto em amostras de soros de bovinos abatidos no Recôncavo da Bahia.

### 2.2 ESPECÍFICO

Ajustar um kit Chimera de ELISA indireto da Embrapa para aplicação de amostragem do Recôncavo da Bahia.

Determinar ocorrência de positividade para tuberculose por *Mycobacterium bovis* em amostras de animais abatidos em frigorífico inspecionado.

Avaliar sensibilidade e especificidade do Kit Embrapa, além de executar seu processo e desenvolvimento, patenteado pela instituição em questão, disponível, no momento, somente para estudo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DEFINIÇÃO

A tuberculose bovina tem como agente etiológico o *Mycobacterium bovis*, trata-se de uma doença crônica infectocontagiosa, que acomete principalmente os bovinos, mas tem incidência em outros tantos animais domésticos e selvagens, o humano também pode se infectar, caracterizando-a como uma zoonose de notificação compulsória (ROMAN et al., 2016); ressalta-se que cerca de 10% da tuberculose humana tem como motivo a tuberculose bovina (BRYNE et al., 2019).

#### 3.2 HISTÓRIA

O médico inglês, Benjamin Marten, em 1720 considerou a origem infecciosa da tuberculose (BARBERIS et al., 2017); naturalmente a sua história começou a ser entendida por Carmichael em 1810 quando se estabeleceu uma relação entre o consumo do leite da vaca por crianças e o aparecimento da doença, erroneamente sendo correlacionado com fatores nutricionais (BEZOS et al., 2014); em 1882, Robert Koch identificou o agente causador e a forma de disseminação da doença, mudando totalmente a perspectiva (DUARTE, 2015).

A detecção da infecção pelo consumo da carne teve início em meados de 1880; em 1899 Robert Von enfatizou sobre a importância do controle de zoonoses para o ser humano. Em 1911 tomou-se consciência que os bovinos tuberculosos eram um risco para saúde pública e que medidas de controle deveriam ser tomadas (GHEBREMARIAM et al., 2018); dentre elas: inspeção da carne, pasteurização do leite e programas de controle da doença nos animais (LAMONT et al., 2014).

No ano de 1890, Koch, viu a possibilidade de identificar os animais contaminados por meio do teste de tuberculina, por ele desenvolvido; o teste se expandiu rapidamente e é utilizado até os dias de hoje, no decorrer dos anos vários pesquisadores colaboraram na melhoria e aprimoramento da

padronização do teste, com o objetivo de refinar sua especificidade e sensibilidade (GOOD et al., 2018).

A vacina, por sua vez, foi desenvolvida em 1921 por Calmette Albert e Guerin Camille, cientistas francesas, a qual ganhou o nome de “Bacilo Clamette-Guerin” (BCG) que é a cepa atenuada do *Mycobacterium bovis* (KAUFMANN et al., 2017).

### 3.3 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose bovina apresenta distribuição mundial, com maior prevalência em países subdesenvolvidos onde o controle e conhecimento para erradicação desta doença são limitados (LEVY, 2012). O teste de tuberculinização seguido do abate de animais positivos tem obtido bons resultados em países que a situação sanitária não é homogênea (CAYROU et al., 2010).

Um pequeno número de países como a Dinamarca, Holanda e Luxemburgo conseguiram erradicar a doença; outros como Espanha, Grécia, Inglaterra, Estados Unidos, Irlanda e Portugal reduziram significativamente (PUROHIT, 2017). No Brasil em 2005 estudos demonstraram a presença da doença em todo território nacional: São Paulo (9%), Espírito Santo (7,6%) e Minas Gerais (4,25%); Santa Catarina é um dos estados com menor incidência (0,5%) (BRASIL, 2016). Um inquérito epidemiológico realizado na Bahia entre outubro de 2008 e novembro de 2010 revelou uma grande prevalência e foco da doença em animais com idade igual ou superior a 24 meses (ALZAMORA FILHO et al., 2014).

O *Mycobacterium bovis* quando acomete humanos é denominado de tuberculose zoonótica, considerada negligenciada em países em desenvolvimento (ROCHA et al., 2012). No ano de 2014 a OMS (Organização Mundial de Saúde) iniciou um projeto que almeja um mundo livre da tuberculose até 2035 (OLEA et al., 2016).

### 3.4 ETIOLOGIA

O principal agente infeccioso da tuberculose bovina é o *Mycobacterium bovis*, uma bactéria Gram-positiva (ABDIFETAH, 2020) álcool-ácido resistente (JEMAL, A.M., 2016); apresentam forma bacilar, delgadas e alongadas, com aproximadamente 0,5 a 0,7µm de comprimento e 0,3µm de largura, imóveis, sem cápsulas ou flagelos (PUROHIT et al., 2017).

Os bacilos podem sobreviver no ambiente por um período de seis meses a quatro anos, a depender da interferência de fatores externos como: temperatura, umidade pH (potencial hidrogênico) e exposição ao sol (MORE et al., 2015). Por possuir uma membrana celular rica em lipídios, consequentemente cursa com resistência a desinfetantes, antibióticos e lesões físicas (JEMAL, A.M., 2016).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MBTC) trata-se de um grupo de bactérias geneticamente próximas que possuem mais de 95% de homologia DNA-DNA (COELHO e MARQUES, 2006); e incluem: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. cannetti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. Microti* (ROCHA et al., 2012), grupo de destaque para o desenvolvimento da doença em bovinos e humanos (MURAKAMI et al., 2009), chama-se atenção para o *M. bovis* e *M. tuberculosis* que possuem a maior incidência (ABDIFETAH, 2020).

### 3.5 SINTOMAS/SINAIS CLÍNICOS

Uma das doenças mais antigas do mundo, a tuberculose se desenvolve com um longo período de incubação, portanto, na sua fase inicial os sinais clínicos são inaparentes e assim permanecem em sua grande maioria; como sinais clínicos, quando assim aparentam, pode-se listar: letargia, anorexia, dispneia e tosse (ASLAM et al., 2019).

A tuberculose pode afetar diferentes localizações, dependendo da via de infecção tem-se o acometimento do pulmão e linfonodos como os mais comuns (KANEENE et al., 2014; SA et al., 2015). Leghari et al (2020), reporta ainda o acometimento de outros órgãos como fígado, baço, pleura e peritônio; o

tubérculo se caracteriza por produzir granulomas nos gânglios linfáticos e por ser uma condição debilitante.

A tuberculose pode ainda acometer glândulas mamárias, que é capaz de desenvolver uma mastite, nestes casos o úbere cursa com sinais de endurecimento e hipertrofia, apresenta-se com grande impacto em decorrência da disseminação para os bezerros e dificuldade de diferenciá-la dos demais tipos de mastite (ROWEE e DONAGHY, 2008).

### 3.6 TRANSMISSÃO

A inserção da tuberculose no rebanho se deve principalmente a aquisição de animais contaminados que disseminam a doença para os outros do rebanho, sem distinção de raça, idade e sexo (WOLF et al., 2014). Animais criados em sistema de estábulo tem uma maior rapidez de contágio em decorrência do contato mais frequente e próximo deste rebanho (THOEN et al., 2010).

O *Mycobacterium bovis* pode ser excretado antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos, pelo: ar, fezes, urina, leite, secreções nasais, vaginais, uterinas e penianas (BORNA et al., 2013; BROOKS et al., 2014). A via respiratória é tida como a mais comum, em decorrência da inalação de aerossóis contaminados; a segunda via se dá por meio da ingestão de leite de vacas infectadas e/ou ingestão de água e alimentos contaminados (BROOKS et al., 2014).

Os seres humanos, por sua vez, adquirem a infecção através da ingestão de leite cru contaminado, pelo ar ou contato com animais infectados (YAHYAOU et al., 2017); a transmissão ocorre com maior incidência em médicos veterinários, pessoas que trabalham em abatedouro, frigoríficos e laboratórios (PHEPA et al., 2016; GHEBREMARIAM et al., 2018).

### 3.7 PATOGENIA

As lesões causadas pelo *Mycobacterium bovis* dependem diretamente da via de infecção (MEHMOOD, 2019), a via aerógena é tida como porta principal,

desta forma a infecção vai agir por meio do acometimento dos linfonodos regionais e pulmão; quando a infecção ocorrer pela via digestiva irá acometer linfonodos do trato gastrointestinal, mesentéricos e hepáticos (LI et al., 2017). A resistência da infecção depende da tríade: carga infectante, poder de virulência e resposta do hospedeiro (PRAUD, 2016).

Quando o antígeno ingressa no organismo, as células começam a se multiplicar e sofrem a fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos; os bacilos irão se multiplicar até destruir estas células, ocorre então uma mobilização de várias células para o local da invasão que alteram e formam células epitelióides (EGBE et al., 2017); recrutam-se monócitos, neutrófilos e células dendríticas. Os monócitos vão fagocitar os bacilos e se dirigirem aos linfócitos Th1 (POLLOCK et al., 1996). Estes componentes que vão derivar os granulomas ou tubérculos (lesões características da tuberculose) (AHMED et al., 2013).

Os fibroblastos aparecem no local para formar uma capa na tentativa de conter a infecção (SHITTU et al., 2013); no período de quatro a seis semanas tem-se a formação do granuloma completo, contudo, entre oito e quatorze dias já pode ser visto microscopicamente (AHMED et al., 2013). As lesões macroscópicas oscilam entre um a três cm de diâmetro, apresentam aspecto purulento, caseoso, envoltos por uma cápsula fibrosa, pode ainda ter necrose ou caseificação no seu interior e em casos mais avançados calcificação (EGBE et al., 2017).

Os indivíduos que cursam com boa resposta imunológica geralmente previnem a disseminação da infecção para outros órgãos (MEHMOOD et al., 2019); ressalta-se que os animais são capazes de transmitir a doença em qualquer estágio da infecção, antes mesmo da formação das lesões (SHITTU et al., 2013; EGBE et al., 2017).

### 3.8 ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS GRANULOMAS

O granuloma é uma estrutura composta por células imunes, dentre elas: monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epitelióides, dendríticas e natural killer (NDLOVU, 2016), compacto e organizado essa estrutura é envolta por uma

camada de linfócitos, possui aspecto de um nódulo inflamado amarelo e caseoso (HOGAN et al., 2001); o granuloma não afeta o hospedeiro, pois não elimina as micobactérias e ao ser formado sua disseminação para outros órgão e tecidos é evitada, classificando a infecção como latente (SUNDARAMURTHY e PIETERS, 2007).

### 3.9 DIAGNÓSTICO

A tuberculose é conhecida por cursar com sinais clínicos inaparentes na fase inicial, considerada como uma doença crônica, possui um longo período latente em que o indivíduo infectado pode estar transmitindo antes que a doença se torne aparente; em função disso a grande importância de identificar e diagnosticar a infecção para impossibilitar a propagação da patologia (TREWBY, 2016).

Os testes para diagnóstico da tuberculose podem ser divididos em dois grupos: direto e indireto; o direto identifica o organismo infeccioso no hospedeiro, ocorre principalmente na fase pós morte e testes para confirmação da lesão como cultura bacteriana; a respeito dos testes indiretos pode-se mencionar os que são realizados antes da morte, pela identificação do *Mycobacterium bovis* em animais vivos (LI, 2016), esta resposta pode ser humoral (anticorpos circulantes) ou celular (mediada por linfócitos/macrófagos) (CHANDRAN et al., 2015).

#### 3.9.1 Diagnóstico clínico

O exame clínico se faz importante em casos mais avançados em decorrência da forma de evolução da doença (THOEN et al., 2010) e pode ser feito através de auscultação, percussão, aferição de temperatura, palpação de glândulas mamárias e linfonodos (KANEENE et al., 2014), avalia-se principalmente linfadenomegalia e exacerbação de sensibilidade dolorosa (RAMOS et al., 2015).

Para este diagnóstico o médico veterinário deve se basear nos sinais clínicos da doença: aumento de linfonodos regionais, fraqueza, dores

respiratórias (CUSHICONDOR, 2014); nos estágios mais avançados observa-se: tosse seca não produtiva, cansaço fácil, dispneia, secreção nasal (KANEENE et al., 2014), emagrecimento progressivo e febre. Em casos de acometimento pulmonar: tosse úmida, dispneia ou taquipneia (RAMOS et al., 2015).

### 3.9.2 Diagnóstico laboratorial

O teste bacteriológico: método direto, considerado como padrão ouro; identifica o patógeno mediante isolamento, cultura e tipificação da bactéria. Em contrapartida ele precisa de um longo período de execução, pois, as bactérias crescem lentamente (DIALLO et al., 2016). As amostras podem ser fixadas em lâminas e coradas pelo método Ziehl Neelsen para identificação em BAAR, possui baixa sensibilidade e alta especificidade (SCHILLER et al., 2010).

O teste molecular: compreende a identificação de ácidos nucleicos por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), considerado um método, rápido, sensível e específico (CALDER et al., 2016); sua sensibilidade oscila entre 65 e 90% e sua especificidade entre 98 e 99% (CEDENO et al., 2005). O interesse por testes moleculares tem aumentado em consequência de os intradérmicos não serem 100% específicos (SOUZA et al., 2016) e pela demora do resultado pelo teste bacteriológico (CLEGG et al., 2011).

A prova de tuberculina: usualmente é o teste mais comum (TORRES, 2010) realizado por via intradérmica (BRASIL, 2006), as tuberculinas sintéticas, chamadas de PPD (Derivado Proteico Purificado), podem ser derivadas do *Mycobacterium bovis* ou do *Mycobacterium avium* (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2006). Realizada em animais vivos, independente do sexo, com idade superior a seis meses de vida, deve ser feito por um médico veterinário habilitado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (BRASIL, 2006).

A técnica consiste em inocular 0,1 ml da tuberculina por via intradérmica na região do pescoço, escápula e na prega caudal, o local da aplicação deve ser passar por tricotomia e a espessura da dobra medida com cutímetro antes da inoculação (LAGE et al., 2006); transcorridos 72h é medido novamente o local



(tamanho, enrijecimento e engrossamento da pele), além da leitura da reação alérgica cutânea (BRASIL,2001).

Animais positivos na prova de tuberculina devem ser encaminhados para o abate e manejo sanitário; o rebanho recebe certificado sanitário para circulação nacional quando resultado na propriedade de todo rebanho for negativo após três testes, realizados num intervalo de 90-120 dias entre o primeiro e o segundo, e entre 180-240 dias entre o segundo e o terceiro, controle este, deve ser feito anualmente (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2006).

O teste sorológico: é utilizado como teste complementar ao teste de tuberculina para melhor averiguação de animais que tiveram resultados inconclusivos (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2006), aumentando a cobertura do diagnóstico (SOUZA et al., 2012); os testes detectam anticorpos específicos (IgG e IgM) de *Mycobacterium bovis* através das amostras de soro e leite (WATERS et al., 2006).

O Kit Chimera: é um teste ELISA que tem como base uma quimera recombinante de ESAT-6/MPB70/MPB83 como o antígeno em bovinos; o qual conta com 79,5% de sensibilidade e 75,5% de especificidade; a amostra utilizada para execução do teste é o soro bovino e está sendo utilizado principalmente como confirmatório quando se tem o teste de tuberculina negativo; seu uso é feito para cobertura diagnóstica e aumenta o controle e retirada de animais contaminados do rebanho (SOUZA et al., 2019).

### 3.10 TRATAMENTO

A tuberculose nos bovinos pode ser controlada e erradicada por meio da identificação e eliminação de animais positivos. O uso de antibioticoterapia e quimioterápicos não são utilizados em decorrência do alto custo, mutação do agente infeccioso e risco de resistência ao antimicrobiano (MANTILLA et al., 2009). Nos humanos, o tratamento é realizado com o uso de antibióticos e pode cursar com efeitos adversos de acometimento hepático (BARTAULA et al., 2017).

### 3.11 PREVENÇÃO E CONTROLE

A vacina BCG não apresenta proteção relevante, atualmente é utilizada para prevenir formas graves da doença (KAUFMANN et al., 2017); contudo, seu uso pode interferir no diagnóstico da tuberculose quando feito pela prova de tuberculina, pois, desenvolve reatividade, denotando falsos positivos no diagnóstico humano (JACOBUS, 2005).

Ao adquirir novos animais para o rebanho deve-se exigir atestados negativos de teste de tuberculose (BRASIL, 2006); outras medidas como limpeza e desinfecção das instalações, exames clínicos e controle do trânsito dos animais podem ser adotadas (GHEBREMARIAM et al., 2016; LI et al., 2017).

A tuberculose deve ser erradicada do rebanho em decorrência das perdas econômicas e importância da tuberculose para saúde pública com o objetivo de minimizar os impactos da doença no rebanho e na população (JACOBUS, 2005). Médicos veterinários certificados pelo MAPA devem testar todos os animais da propriedade e sacrificar os positivos; para obter o certificado pela PNCEBT, os testes devem ser repetidos anualmente (BRASIL, 2006).

### 3.12 IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA

Nos humanos os sinais clínicos vão depender da via de infecção, sendo a por via oral a mais comum, adquiridos por meio da ingestão de alimentos contaminados (leite cru, por exemplo) (BILAL et al., 2010); Indivíduos portadores crônicos podem cursar com: tosse, mal-estar, sudorese noturna, febre, anorexia e dor torácica (NOGUEIRA et al., 2012). Na radiologia a infecção causada pelo *Mycobacterium bovis* é indistinguível do *Mycobacterium tuberculosis*, ambas podem evoluir para quadros graves (BILAL et al., 2010).

A OMS (2019) relata que a tuberculose está entre as 10 principais causas de óbito no mundo, em 2018 foram diagnosticadas 10 milhões de pessoas infectadas, das quais 1,5 milhões vieram a óbito; deve-se levar em consideração que a tuberculose é a principal causa de morte em pessoas com o vírus HIV (OMS, 2019).

Com base nos estudos feitos no Brasil, a tuberculose pôde ser identificada tanto no gado de corte como no gado de leite, faz-se necessário uma medida de erradicação para evitar o contágio da doença e aumento do percentual desta doença; com o objetivo de reduzir o impacto zoonótico na população, especialmente em grupos de risco (DYE e WILLIAMS, 2010).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AREA DE ESTUDO

A área de estudo compreende a região do Recôncavo da Bahia, situada na região do Nordeste, totalizando uma área de 5,2 mil quilômetros quadrados. O clima semiárido, com as temperaturas anuais oscilando entre máxima de 32°C e mínima de 14°C, tendo o Rio Paraguaçu como o principal da região. A inclusão do Recôncavo neste estudo se dá a necessidade de identificação do patógeno *M. bovis* nas propriedades rurais locais.

### 4.2 DESENHO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Trata-se de um estudo de casuística, em que foram utilizadas 430 amostras de soro de bovinos da região do Recôncavo da Bahia cedidas pela ADAB. Em que, juntamente com o projeto de Mestrado em Defesa Agropecuária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, realizou o experimento para demonstrar a eficácia do teste Chimera iELISA como método diagnóstico para tuberculose bovina.

### 4.3 PADRONIZAÇÃO DO TESTE CHIMERA

A avaliação da presença de anticorpos foi realizada por meio do teste qualitativo que usa o artifício do ELISA indireto e que conta com o auxílio de proteínas peptídicas, específicas: MPB70, MPB83 e ESAT-6 de *Mycobacterium bovis*, confirmando ou não o contato do animal com a enfermidade.

Ao adquirir o teste, o mesmo deve ser armazenado entre 2 e 8°C, deve-se ainda estar atento ao prazo de validade, evitar contaminação do kit e não expor os reagentes do kit a luz forte ou a agente oxidantes, o manuseio do MTB deve ser em vidro limpo ou utensílio de plástico.

A amostra para o teste deve ser soro bovino, utiliza-se apenas 10µl de soro por teste. A coleta de sangue procedeu-se de maneira asséptica e colocada em tubos. Espera-se o sangue coagular para separar o soro, em caso de

armazenamento o soro deve ser mantido entre 2 e 8°C ou congelamento a -20°C se não for utilizá-lo em até 72 horas.

No preparo: os reagentes do kit devem atingir temperatura ambiente entre 20 e 25°C, retira-se a placa revestida com peptídeo da embalagem de alumínio, deve-se remover apenas o número de poços que serão utilizados e então armazenar os restantes entre 2 e 8°C.

O tampão de lavagem: devem ser preparados misturando uma parte do tampão 10X com 9 partes de água destilada, devendo estar em temperatura ambiente antes do uso, a quantidade de tampão necessária para lavar uma placa é de 300ml; este tampão pode ser mantido em temperatura ambiente por até 1 mês.

O conjugado 100X: deve ser misturado antes do uso, diluir o conjugado na proporção 1:100, em que se faz a combinação de uma parte do conjugado 100X com 99 partes. Após o uso manter o conjugado 100X entre 2 e 8°C. Deve-se ainda proteger a diluição da luz, a qual tem de ser usada no mesmo dia em que foi diluída.

As amostras: devem ser bem misturadas antes do uso, e pré-diluídos os controles e amostras na proporção 1:20, utiliza-se a placa de transferência ou microtubos, misturar bem antes de processar; para placas usa-se agitador de placas e para tubos usa-se misturados vórtex.

O teste: Transfere-se 100µl das amostras pré-diluídas e controle para todos os poços da placa revestida com cBTB. Pipeta-se o controle em duplicatas. A placa deve ser coberta e incubada por 60 minutos entre 36 e 38°C, em seguida lava-se a placa: descarta o conteúdo, lava quatro vezes com tampão de lavagem, bate a placa no papel absorvente após a última lavagem; 100µl de conjugado deve ser adicionado em cada poço, incubado por 15 minutos em temperatura ambiente, em seguida deve-se adicionar 100µl de solução de paragem em cada poço e por fim a leitura será feita em a 450nm em um leitor de microplaca.

Validação do teste: a densidade óptica dos negativos deve ser inferior a 0,200. E considerada positiva quando superior a 0,800. Caso os critérios não

sejam atendidos, os resultados são considerados inválidos e as amostras devem ser testadas novamente.

#### 4.4 PROTOCOLO DA EMBRAPA GADO DE CORTE PARA ELABORAÇÃO DO TESTE

A Embrapa tem como objetivo estabelecer um procedimento padrão para que seja determinado a concentração de antígeno e diluição dos soros utilizados em Elisa com proteínas recombinantes de patógenos. Do qual engloba os laboratórios: Engenharia de Genética Animal e o de Imunologia Aplicada. E tem como base principal o livro “Guia do ELISA” por Crowther (2002).

É obrigatório o uso de condutas de segurança com equipamentos de proteção individual (EPI). Os equipamentos que se fazem necessários à realização do teste incluem: incubadora 37°C, micropipetas e multicanal, pipetador automático, leitor de Elisa, lavadora de placa Elisa (opcional), Vortex.

Os materiais que se fazem necessários incluem: placa 96 poços para Elisa, ponteiras descartáveis, grade para tubos, microtubos estéreis de polipropileno (1,5ml), pisseta e vidrarias de vidro de diversas capacidades.

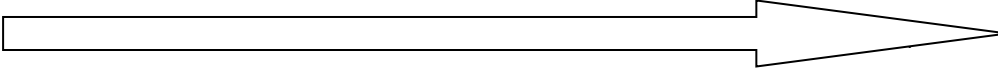
Os materiais bioquímicos que se fazem necessários incluem: tampão carbonato-bicarbonato, PBS 20 – Tween, leite desnatado, antibovis (disponibilizado pelo teste), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5N, amostras de soros testados positivos e negativos, além das amostras de soro a serem executadas no teste.

Para execução do teste recomenda-se que a temperatura ambiente esteja mantida em 25°C, deve-se ainda evitar oscilações de temperatura no laboratório de análise.

No dia anterior realizou-se a sensibilização das placas com a diluição do antígeno solubilizado com SDS 2% na proporção 1:100 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M em pH 9,6 de sensibilização. Para a preparação das 2 placas (controle positivo – placa 1 e negativo – placa 2), foi preparado o volume de 4ml para iniciar a diluição. Utilizou-se desta forma 40µl do antígeno solubilizado e 3960µl de tampão, desta forma, a concentração inicial é de 2mg/ml. A primeira coluna de cada placa apresenta-se com 20µg/ml de antígeno em cada poço.

Dando seguimento aplicou-se 200µl da diluição inicial em todos os poços da primeira coluna (intitulada coluna 1) conforme demonstrado na tabela abaixo (Quadro 1), modelo de amostragem iguais para o controle positivo e negativo.

Quadro 1: Placa de ELISA com 96 poços - aplicação na horizontal.



A	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
B	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
C	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
D	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
E	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
F	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
G	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
H	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0

Aplicou-se 100µl de tampão de sensibilização preenchendo em todos os poços entre a coluna 2 e 11. Utilizou-se a pipeta multicanal para transferir 100µl da coluna 1 para a coluna 2, realizou-se a homogeneização de forma cuidadosa (sem formar bolhas de ar) e seguiu com a transferência de 100µl da coluna 2 para a 3 e assim sucessivamente até a coluna 11, na qual, por ser a última do processo, descartou-se os 100µl pós a homogeneização. O procedimento foi realizado nas 2 placas. Vale ressaltar que a coluna 12 seguiu preenchida apenas com a solução tampão (100µl), sem a presença do antígeno. Posterior este processo, as placas foram incubadas em câmara úmida a 4°C por 16 horas.

No dia seguinte para realizar a execução Do Elisa realizou-se a lavagem das placas 4x em PBS 20 – Tween 0,05% (500µl de Tween em /L de água destilada). Realiza-se o “bater placa” para secar os poços. E aplica-se então a diluição composta por 200 µl de PBS 20 + Tween (0,05%) com desnatado 5%

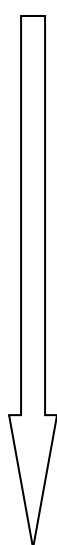
em todos os poços, com o objetivo de bloquear campos inespecíficos e leva-se então a incubadora a 37°C por 1 hora.

Enquanto aguardava-se o tempo de incubação, foi realizado a diluição do pool de soro do controle positivo e negativo na proporção 1:100, com volume de 3ml cada, desta forma temos: 30µl de pool de soro em 2970µl de PBS 20 + Tween 0,05% com leite desnatado 1%. Deve-se manter os tubos com a diluição do controle inicial refrigerados até sua aplicação nas placas.

Após período de incubação as placas foram lavadas com PBS 20 + Tween (0,05%) por 4 vezes e batidas até secar. Aplicou-se então 200µl do pool de soro diluído na proporção 1:100 em todos os poços da primeira linha (A) (Quadro 2), deve-se enfatizar que as placas são montadas da mesma forma, sendo uma o controle positivo e a outra o controle negativo.

Quadro 2: Placa de ELISA com 96 poços - aplicação na vertical.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl
B	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
C	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
D	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
E	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
F	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
G	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Aplicou-se 100µl de PBS 20 + Tween 0,05% com leite desnatado 1% em todos demais poços da linha B a H. Posterior inicia-se a diluição seriada por meio da transferência de 100µl da linha A para a B e assim sucessivamente, até a linha G, onde após a diluição deve-se descartar o material pós homogeneização. Protocolo válido para ambas as placas (controle positivo e negativo), realizado com auxílio da pipeta multicanal.



Realizou-se então a incubação destas placas em estufa de câmara úmida na temperatura de 37°C por mais 1 hora com seus respectivos soros já diluídos. Lava-se então as placas após este período com PBS 20 + Tween 0,05%.

Preparou-se o conjugado (PBST + antibovis) na diluição de 1:10.000 (2,2µl do conjugado + 22ml de PBS Tween 0,05% com leite desnatado 1%). Aplica-se 100µl do conjugado em todos os poços de ambas as placas e novamente incuba por mais 1 hora a 37°C. Posteriormente, lava-se as placas com PBS 20 + Tween 0,05% por 4 vezes e bate até secar. Colocou-se então TMB (substrato) 95µl por poço e deixou agir por 12 minutos. Para interromper a reação foi utilizado 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5N.

As placas foram levadas para leitura em leitor de ELISA com filtro 450nm e realizado a análise dos dados em gráficos, definido 1:400 soro + 10 µg, para a margem da leitura considera-se melhor resultado quando estiver mais perto de 5.

Ressalta-se que para definição dos pools positivos e negativos as amostras selecionadas possuíam estudos em lesão, cultura bacteriana e PCR. O controle positivo foi formado por amostra do Rio Grande do Sul na região de Bom Retiro (1) e Arroio (2). E as amostras negativas da região de Arroio, Rio Grande do Sul (3 e 4).

O controle de qualidade deve incluir controle positivo, negativo e branco (PBS 20 + Tween 0,05% + 1% de leite desnatado).

Os resíduos foram descartados de acordo sua composição:

- Ponteiras, tubos e placas utilizadas no teste foram armazenadas temporariamente em bombonas e destinadas a empresas especializadas.

- Sobras de amostras e resíduos contendo líquidos corpóreos (sangue/soro), passaram por autoclaves para esterilização e foram armazenadas em sacos brancos identificados como resíduos biológicos e incinerados por empresas especializadas.



Figura 1: A- Materiais utilizados durante a execução do teste, inclusos: 1 descarte de ponteiras, 2 frascos de PBS Tween 20, 2 pipetas multicanais e 1 caixa de ponteiras amarelas. B- Agitador magnético. C- Suportes de tubos usados e da banheira para dispor as soluções a serem aplicadas na placa. D- Placas de Elisa utilizadas na execução do Teste Elisa Chimera pós sensibilização e antes da análise dos dados (arquivo pessoal).

#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

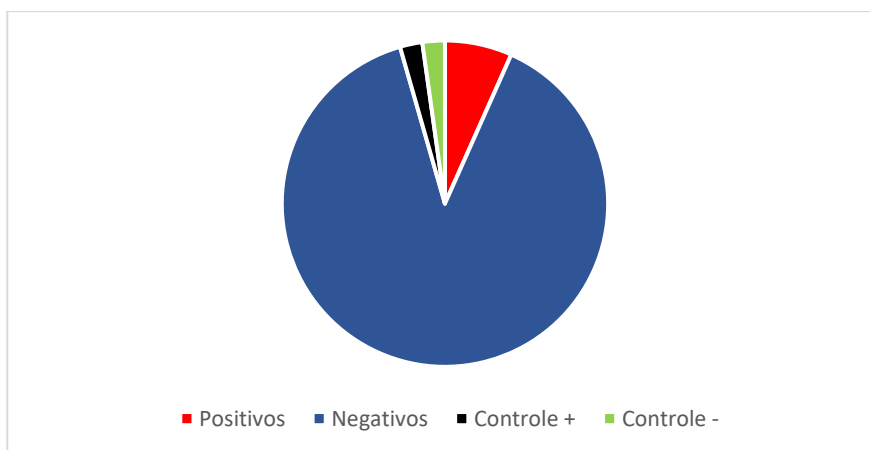
As amostras foram cedidas pela ADAB, órgão de fiscalização da Bahia, em questões éticas e os resultados foram obtidos por meio do teste Kit Chimera foram direcionados para uma planilha no excel, agrupados, e realizado a média das duplicatas para serem comparados ao valor do *cutt*of e então definir os resultados em positivos (reagentes) e negativos (não reagentes).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A classificação da amostra em positiva ou negativa é realizada por meio de uma média de corte, também chamada de *cutoff*, em que foi realizado a média dos três controles negativos usados neste trabalho ( $0,065 + 0,115 + 0,206 / 3 = 0,146$ ). Desta forma calcula-se a média, com o desvio padrão (0,10258) para se obter o *cutoff* que na pesquisa em questão teve como valor: **0,483**.

Resultados obtidos com a leitura das placas após execução com o kit Chimera estão disponíveis no Gráfico 1 a seguir, observam-se as amostras negativas identificadas em azul e as amostras positivas em vermelho.

Gráfico 1 – Resultados das amostras Kit Chimera após utilizar o *cutoff* 0,483 como média de classificação



Com base nos dados listados acima em resultados pode-se afirmar que de 430 amostras executadas, 30 estão identificadas como positivas (reagente ao teste), seguindo o *cutoff*. Desta forma, tem-se aproximadamente 7% das amostras com diagnóstico positivo/reagente.

As placas, sem exceção, contaram com o controle positivo e controle negativo, com o objetivo de se avaliarem os experimentos e em todas as placas ambos tiveram representação eficaz, 100% positivo em todas as placas o controle positivo e 100% negativo em todas as placas o controle negativo. O que determina a viabilidade do teste Elisa Chimera e sua eficácia no diagnóstico da Tuberculose nas análises em questão, corrobora Frey et al., 1998.

O trabalho desenvolvido pela Embrapa denota que o teste é realizado de acordo a identificação de anticorpos, por meio de diagnóstico ELISA qualitativo de forma indireta e conta com auxílio de proteínas peptídicas específicas: MBP70, MBP 83 E ESAT- 6 de *Mycobacterium bovis*, para confirmar ou não o contato do animal com a enfermidade de acordo resposta imune, corrobora Souza et al., 2019.

Oliveira e colaboradores (2020) abordam no estudo realizado em carcaças de frigoríficos da região do Maranhão, no período entre janeiro de 2013 e dezembro de 2018, que identificou 20 animais positivos num total de 207.557 animais examinados; e reafirma sobre a baixa prevalência do estudo ser em consequência do perfil dos bovinos (aptidão de corte). Assim como nas amostras utilizadas no teste Chimera.

Alzamora e colaboradores (2014) realizaram a identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia durante o período de abril de 2009 a abril de 2013 e teve como resultado 14% (25/180) das amostras com crescimento na bacteriologia.

Costa (2012) demonstrou, por meio de um estudo epidemiológico produzido nas principais regiões econômicas do estado da Bahia, que a prevalência da tuberculose bovina nesta área é de 0,9 a 2,9%, e acomete 6,2 a 26,3% dos rebanhos. Ao se avaliar juntamente a este estudo, a região do Recôncavo da Bahia se enquadra dentro desta porcentagem, pois, dentro de uma análise com 430 amostras de soro bovino, 7% foram identificadas como positivas.

A baixa prevalência da tuberculose bovina, propicia a implantação de um sistema de vigilância para a detecção dessa enfermidade, como uma forma de acelerar o processo de erradicação no estado, contudo, requer uma união entre os serviços de inspeção e os laboratórios diagnósticos, corrobora Santos 2014 que investiga a região do Recôncavo da Bahia por meio de PCR.

## 6 CONCLUSÃO

A tuberculose bovina foi identificada na região do Recôncavo da Bahia, com base no Kit ELISA chimera, através de amostras de soro, disponibilizadas pela ADAB, para o estudo em questão, e cursou com uma prevalência de 7% no total das 430 amostras analisadas.

Pode-se afirmar, com base no presente estudo, que o teste Elisa Chimera possui resposta de identificação no controle dos animais positivos e negativos, uma vez que as amostra de controle (positivo e negativo) permaneceram com 100% de exatidão em todas as placas testadas juntamente as amostras, destacando-o como sensível e específico.

O uso de medidas preventivas e de controle para a tuberculose é, por ser uma enfermidade de caráter zoonótico. Desta forma, a adesão de um serviço com precisão e rápida resposta ajudam a evitar difusão da doença; e podem ainda auxiliar a integração do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina, reduzir as perdas, e redução dos problemas relacionados à saúde.

## REFERÊNCIAS

ABAKAR, M. F.; AZAMI, H. Y.; BLESS, P. J. Transmission dynamics and elimination potential of zoonotic tuberculosis in morocco. **PLoS Negl Trop Dis**. p. 1-17, 2017.

ABDIFETAH, M. Bovine tuberculosis at the human–livestock–wildlife interface and its control through one health approach in the Ethiopian Somali Pastoralists: A review. **One Heal**. v. 9, 2020.

AHMED, A. M.; ISMAIL S. A. S.; DESSOUKI, A. A. Pathological lesions survey and economic loss for male cattle slaughtered at Ismailia abattoir. **Internotional Food Research Journal**. v. 20, p. 857-863, 2013.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. **Intituto FNP**, v. 1, 2019.

ASLAM, M. S.; JAVE, D. M. T.; KHAN, A.; IQBAL, Z.; ASLAM, M. S.; JAVED, M. T. Bacterial and PCR based diagnosis of naturally occurring bovine tuberculosis in cattle and buffaloes. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**. v.56, p. 481-487, 2019.

BANOS, G.; WINTERS, M.; MRODE, R.; MITCHELL, A. P.; BISHOP, S. C.; WOOLLIAMS, J. A. Genetic evaluation for bovine tuberculosis resistance in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 100, p. 1272-1281, 2017.

BARBERIS, I.; BRAGAZZI, N. L.; GALLUZZO, L.; MARTINI, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of koch's bacillus. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**. v. 58, p. 9-12, 2017.

BARTAULA, B.; PRADHAN, B.; BHATTA, N.; NAVEEN, P.; BARAL, D.; MUDBHARI, B. Study of predictive factors of anti-tuberculosis treatment induced hepatotoxicity. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, p. 210, 2017.

BEZOS, J.; ÁLVAREZ, J.; ROMERO, B.; DE JUAN, L.; DOMÍNGUEZ, L. Bovine tuberculosis: Historical perspective. **Research in Veterinary Science**. v. 97, 2014.

BILAL, S.; IQBAL, M.; MURPHY, P.; POWER, J. Human bovine tuberculosis - Remains in the differential. **Journal of Medical Microbiology**. v 59, p. 1379-1382, 2010.

MULLER, B.; DURR, S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; HELDEN, V. Zoonotic *M.bovis*-induced tuberculosis in humans. **Emerging Infectious Diseases**. v. 19, p. 899-908, 2013.

BRASIL. **Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina**. Inspeção de Produtos de Origem Animal. Florianópolis, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estudos de caracterização epidemiológica para brucelose e tuberculose em bovinos**.

Brasília; 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal>. Acessado em: 06 JUN 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 2, de 10 de janeiro de 2001**. Brasil; 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. Brasília: 2006.

BROOKS, P. E.; ROBERTS, G. O.; KEELING, M. J. A dynamic model of bovine tuberculosis spread and control in Great Britain. **Nature**. v. 511, p. 228-231, 2014.

BYRNE, A. W.; ALLEN, A. R.; O'BRIEN, D. J.; MILLER, M. A. Bovine tuberculosis - international perspectives on epidemiology and management. **Frontiers in Veterinary Sciences**. v. 6, p. 1-5, 2019.

CALDER, B.; ALBELDAS, C.; BLACKBURN, J. M.; SOARES, N. C. Mass spectrometry offers insight into the role of ser/thr/tyr phosphorylation in the mycobacteria. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 1-8, 2016.

CAYROU, C.; TURENNE, C.; BEHR, M. A.; DRANCOURT, M. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. **Frontiers in Microbiology**. v.3, p. 687-694, 2010.

CEDEÑO, I.; DE OBALDÍA, R.; SANJUR, O.; BAYARD, V.; ORTEGA, B. E.; ESCOBAR, C. Use of the polymerase chain reaction for diagnosing bovine tuberculosis in Panama. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics). v. 24, p. 1067-1075, 2005.

CHANDRAN, A.; ANTONY, C.; JOSE, L.; MUNDAYOOR, S.; NATARAJAN, K.; KUMAR, R. A. *Mycobacterium tuberculosis* Infection Induces HDAC1-mediated suppression of IL-12B gene expression in macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 5, p. 1-14, 2015.

CLEGG, T. A.; GOOD, M.; DUIGNAN, A.; DOYLE, R.; MORE, S. J. Longer-term risk of *Mycobacterium bovis* in Irish cattle following an inconclusive diagnosis to the single intradermal comparative tuberculin test. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 102, p. 255-264, 2011.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. A. Etiologia. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 5, 2006.

COSTA. L. B. Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia. 2012. **Tese** (Pós-graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal da Bahia, Bahia; 2012.

CUSHICÓNDOR, D. Prevalência de tuberculosis bovina (TBB) mediante inspección post-mortem y cultivo bacteriológico en el matadero municipal del cantón Mejía (Pichincha). **Universidad Central Del Ecuador**. 2014.

DIALLO, M.; DIARRA, B.; SANOGO, M.; SOMBORO, A. M.; DIALLO, M. H.; TRAORÉ, B. Molecular identification of *Mycobacterium bovis* from cattle and human host in Mali: expanded genetic diversity. **BMC Veterinary Research**. p. 1-9, 2016.

DUARTE, I. Sanatorios para tuberculosos: auge y decadencia. **Revista Médica Clínica Las Condes**. v. 26, p. 409–418, 2015. Disponível em: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-pdf-S0716864015000796>. Acessado em: 10 MAIO 2023.

DYE, C.; WILLIAMS, B. G. The population dynamics and control of tuberculosis. **Science**. v. 80, p. 856-861, 2010.

EGBE, N. F.; MUWONGE, A.; NDIP, L.; KELLY, R. F.; SANDER, M.; TANYA, V. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Cameroon. **Scientific Reports**. v. 7, p. 1-17, 2017.

ALZAMORA, F.; REIS, V. M.; FEHLBERG, I.; ALCANTARA, A. C.; CAVALCANTE, M. P.; ROCHA, V. C. F.; COSTA, J. N. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1585-1591, 2014.

FIRDESSA, R.; TSCHOPP, R.; WUBETE, A.; SOMBO, M.; HAILU, E.; ERENDO, G. High prevalence of bovine tuberculosis in dairy cattle in central Ethiopia: Implications for the dairy industry and public health. **PLoS One**. v. 12, 2012.

GHEBREMARIAM, M. K.; MICHEL, A. L.; VERNOOIJ, J. C. M.; NIELEN, M.; RUTTEN, V. P. M. G. Prevalence of bovine tuberculosis in cattle, goats, and camels of traditional livestock raising communities in Eritrea. **BMC Veterinary Research**. v. 14, p. 1-13, 2018.

GHEBREMARIAM, M. K.; RUTTEN, V. P.M. G.; VERNOOIJ, J. C. M.; UQBAZGHI, K.; TESFAALEM, T.; BUTSUAMLAK, T. Prevalence and risk factors of bovine tuberculosis in dairy cattle in Eritrea. **BMC Veterinary Research**. v. 12, p. 80, 2016.

GOOD, M.; BAKKER, D.; DUIGNAN, A.; COLLINS, D. M. **The history of in vivo tuberculin testing in bovines: tuberculosis, a “one health” issue**. *Front Vet Sci*, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/full>. Acessado em: 15 JAN 2023.

GUMI, B.; SCHELLING, E.; BERG, S.; FIRDESSA, R.; ERENDO, G.; MEKONNEN, W. Zoonotic transmission of tuberculosis between pastoralists and their livestock in south-east Ethiopia. **Ecohealth**. v. 9, p. 139-149, 2012.

HOGAN, L. H.; MARKOFSKI, W.; BOCK, A.; BARGER, B.; MORRISSEY, J. D.; SANDOR, M. *Mycobacterium bovis* BCG-induced granuloma formation depends on gamma interferon and CD40 ligand but does not require CD28. **Infection and Immunity**. v. 69, p. 2596-2603, 2001.



SOUZA, I. F. S.; RODRIGUES, R. ARRUDA.; JORGE, K. S. G.; SILVA, M. R.; LILENBAUM, W.; VIDAL, C. E. S.; ETGES, R. N.; KOSTOVIC, M.; ARAUJO, F. R. ELISA using a recombinant chimera of ESAT-6/MPB70/MPB83 for *Mycobacterium bovis* diagnosis in naturally infected cattle. **The Journal Veterinary Medical Science**. v 81, p. 9-14, 2019.

JACOBUS, H. Tuberculosis bovina. Manual de Ganadería Doble Propósito. **Research Gate**. Venezuela; p. 364-369, 2005.

JEMAL, A. M. Review on Zoonotic Importance of Bovine Tuberculosis and Its Control. **OALib**. v. 3, p. 1-13, 2016.

KANEENE, J. B.; MILLER, R.; STEELE, J. H.; THOEN, C. O. Preventing and controlling zoonotic tuberculosis: a One Health approach. **Veterinária Italiana Impact Factor**. v. 50, p. 7-22, 2014.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmers in Latin American and Caribbean countries, **Veterinary Microbiology**. v.112, p. 111-118, 2006.

KAUFMANN, S.; WEINER, J.; VON, R. F. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. **International Journal Infectious Diseases**. v. 56, p. 56-263, 2017.

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MULLER, E. E.; POESTER, F. P.; CAVALLÉRO, J. C. M.; FERREIRA, N. J. S. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006.

LAMONT, E. A.; JANAGAMA, H. K.; RIBEIRO, L. J.; VULCHANOVA, L.; SETH, M.; YANG, M. Circulating *Mycobacterium bovis* peptides and host response proteins as biomarkers for unambiguous detection of subclinical infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52, p. 536-543, 2014.

LEGHARI, A.; KAMBOH, A. A.; LAKHO, S. A.; KHAND, F. M.; MALHI, K. K.; CHANDIO, I. B. Prevalence and risk factors associated with bovine tuberculosis in cattle in Hyderabad and Tando Allahyar Districts, Sindh, Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**. v. 52, p. 207-212, 2020.

LEVY, S. The evolution of tuberculosis. **Bioscience**. v. 62, p. 625-629, 2012.

LI, P.; WANG, R.; DONG, W.; HU, L.; ZONG, B.; ZHANG, Y. Comparative proteomics analysis of human macrophages infected with virulent *Mycobacterium bovis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 7, p. 1-15, 2017.

LI, S. **Evaluating surveillance strategies for bovine tuberculosis in Scotland**. The University of Edinburgh. 2016.

MANTILLA, G. J.; ORTIZ, M. M.; ACOSTA, A. M.; ACOSTA, G. R. J. **Diagnóstico De tuberculosis bovina por aislamiento bacteriológico o**

**histopatológico de vacunos reactivos a la prueba de tuberculina.** Senasa. 2009.

MCCULLOCH, S. P.; REISS, M. J. Bovine Tuberculosis and Badger Control in Britain: Science, Policy and Politics. **Journal Agriculture Environ Ethics.** v. 30, p. 469-484, 2017.

MEHMOOD, A. **Investigating the role of conglutinin in host- pathogen interactions in 63 bovine tuberculosis.** Brunel University London, 2019. Disponível em: <https://bura.brunel.ac.uk/handle/2438/19041>. Acessado em: 07 JUN 2023.

MEMON, M. R.; LATIF, A.; GHASUDDIN, S.; KHATRI, P.; BALOCH, J.; RIAZ, A. Prevalence and pathological lesions of bovine tuberculosis assessment through routine procedures of meat inspection in infected cattle in Karachi metropolitan corporation abattoirs. **Pure and Applied Biology.** v. 8, p.1909-1918, 2019.

MORE, S. J.; RADUNZ, B.; GLANVILLE, R. J. Review: lessons learned during the successful eradication of bovine tuberculosis from Australia. **Veterinary Record Open.** v.177, p. 224-232, 2015.

MURAKAMI, P. S.; BENÍCIO, R.; FUVERKI, N. Tuberculose AW. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da Unipar.** v.12, p. 67-74, 2009.

NDLOVU, H.; MARAKALALA, M. J. Granulomas and inflammation: host-directed therapies for tuberculosis. **Frontiers in Immunology.** 2016.

NOGUEIRA, A. F.; FACCHINETTI, V.; DE SOUZA, N.; ROCHA, T.; VASCONCELOS, A. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos Tuberculosis: a general approach of the main aspects. **Revista Brasileira de Farmácia.** v. 23, p. 3-9, 2012.

OLEA, P. F.; MUWONGE, A.; PERERA, A.; DEAN, A. S.; MUMFORD, E.; ERLACHER, V. E. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* - a call for action. **Lancet Infect Diseases.** v. 17, 2016.

OLIVEIRA, J. A. S.; BEZERRA, N. P. C.; PAIXÃO, A. P.; FONSECA, L. S. Estudo retrospectivo da tuberculose bovina no estado do Maranhão: 2013 a 2018. **PUBVET.** v.14, p.1-10, 2020.

OMS. **Tuberculosis**, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>. Acessado em: 05 MAIO 2023.

PHEPA, P. B.; CHIROVE, F.; GOVINDER, K. S. Modelling the role of multi-transmission routes in the epidemiology of bovine tuberculosis in cattle and buffalo populations. **Mathematical Bioscience.** v. 277, p. 47-58, 2016.

POLLOCK, J. M.; POLLOCK, D. A.; CAMPBELL, D. G.; GIRVIN, R. M.; CROCKARD, A. D.; NEILL, S. D. Dynamic changes in circulating and antigen-

responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Immunology**. v. 87, p. 236-241, 1996.

PRAUD, A.; BOIREAU, C.; DUFOUR, B. Sensitivity of  $\gamma$ -interferon test used in series after tuberculin test to detect bovine tuberculosis. **Veterinary Record**. v. 179, p. 174, 2016.

PUROHIT, M. R.; SVILAND, L.; WIKER, H.; MUSTAFA, T. Rapid and Specific Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by Immunostaining of Tissues and Aspirates with Anti-MPT64. **Applied Immunohistochemistry e Molecular Morphology**. v. 25, p. 282-288, 2017.

RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal of Biology**. v. 75, p. 830-837, 2015.

ROCHA, V. C. F.; FIGUEIREDO, S. C.; ELIAS, A. O.; LEÃO, D. A. S.; NETO, J. S. F. *Mycobacterium bovis* como agente causal da tuberculose humana. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. v. 10, p. 22-31, 2012.

ROMÁN, F.; CHÁVEZ, R. Prevalencia de enfermedades que afectan la reproducción em ganado bovino lechero del cantón loja prevalence of diseases that affect reproduction in dairy cattle. **Revista de Investigações**. p. 83-90, 2016.

ROWE, M. T.; DONAGHY, J. *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. **International Journal of Dairy Technology**. v. 61, p. 317-326, 2008.

SA, A. S.; OKOLOCHA, E. C.; DZIKWI, A. A.; KWAGA, J. K. P.; USMAN, A.; GAMAWA, A. A. Molecular identification of *mycobacterium bovis* from post-mortem inspected cattle at the abattoir and slaughter houses in bauchi state, Nigeria. **British Journal of Medicine and Medical Research**. v. 5, p. 1220-1229, 2015.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H. M.; PALMER, M. V.; HARRIS, B. N.; ORLOSKI, K. A. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in 55 view of their relevance for disease control and eradication. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 57, p. 205-220, 2010.

SHITTU, A.; CLIFTON, H. R.; ELY, E.; UPTON, P.; DOWNS, S. Factors associated with bovine tuberculosis confirmation rates in suspect lesions found in cattle at routine slaughter in Great Britain, 2003-2008. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 110, p. 395-404, 2013.

SOUZA, I. I. F.; MELO, E. S. P.; RAMOS, C. A. N.; FARIAS, T. A.; LUIZA, A.; OSÓRIO, A. R. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. **Springerplus**. v. 1, p. 1-6, 2012.

SOUZA, M. A.; BOMBONATO, N. G.; SOARES, P. M.; RAMOS, G. B.; CASTRO, I.P.; MEDEIROS, A. A. Exames complementares no diagnóstico da tuberculose em bovinos reagentes à tuberculinização comparada. **Arquivo Institucional de Biologia**. v. 83, p. 1-8, 2016.

SOUZA, M. A.; BOMBONATO, N. G.; SOARES, P. M.; RAMOS, G. B.; SANTOS, M. P.; GANDA, M. R. Frequência de lesões macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. **Arquivo Institucional de Biologia**. Sao Paulo, v. 81, p. 363-367, 2014.

SUNDARAMURTHY, V.; PIETERS, J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. **Microbes and Infects Journal**. v. 9, p. 1671-1679, 2007.

THOEN, C. O.; LOBUE, P. A.; ISABEL, K. Why has zoonotic tuberculosis not received much attention?. **Internetwork Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**. v. 14, p. 1073-1074, 2010.

TORRES, P. Las pruebas tuberculínicas en el ganado bovino. **Programa de Controle a Tuberculose**. 2010

TREWBY, H. The genetic and spatial epidemiology of bovine tuberculosis in the UK: 64. **University of Glasgow**. 2016.

WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; BANNANTINE, J. P.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G. Early antibody responses to experimental Mycobacterium bovis infection of cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 13, p. 648-654, 2006.

WOLF, T. M.; SREEVATSAN, S.; TRAVIS, D.; MUGISHA, L.; SINGER, R. S. The risk of tuberculosis transmission to free-ranging great apes. **American Journal Primatology**. v. 76, p. 2-13, 2014.

YAHYAOU, A. H.; ABOUKHASSIB, H.; BOUSLIKHANE, M.; BERRADA, J.; RAMI, S.; REINHARD, M. Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two slaughterhouses in Morocco. **BMC Veterinary Research**. v. 13, p.1-7, 2017.