

# Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização

## Comparative study of complementary diagnostic methods of bovine tuberculosis on skin-test reactive cattle

Suzana de Almeida Fráguas,\* Márcia Souza Cunha-Abreu,\*\* Ana Maria dos Reis Ferreira,\*\* Carla Dray Marassi,\*\*\* Walter Oelemann,\*\*\* Leila de Souza Fonseca,\*\*\* Rachel Ferreira,\* Walter Lilienbaum\*

### Resumo

A tuberculose bovina é uma enfermidade infecciosa de ocorrência mundial. O teste intradérmico é o método padrão para seu diagnóstico da tuberculose, embora possa carecer de sensibilidade e especificidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina incluindo os exames macroscópicos de tecidos, histopatológico, bacteriológico e ELISA. Um total de 97 bovinos reagentes à prova de tuberculinização foi testado, e amostras de tecidos e soro foram colhidas no momento do abate. Do total de bovinos examinados, 70 (72,16%) apresentaram lesão macroscópica sugestiva de tuberculose. Na avaliação histopatológica, 63 animais (64,95%) apresentaram lesão granulomatosa característica. Assim, a histopatologia concordou com a avaliação macroscópica em 92,78% das amostras. Em 47 (48,45%) amostras foram visualizados Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR), todas positivas à histopatologia ou à avaliação macroscópica. Com relação à cultura bacteriológica, foram isolados *Mycobacterium bovis* em apenas 11 amostras (11,34%). Quanto ao desempenho do teste de ELISA, 33 (34,02%) soros foram reativos. O exame macroscópico detalhado associado ao exame histopatológico, devido à sua alta especificidade, são recomendados como ferramentas complementares e podem ser utilizados para confirmar os casos duvidosos no abatedouro.

**Palavras-chave:** tuberculose bovina, exame macroscópico, histopatologia, bacteriologia, ELISA.

### Abstract

Bovine tuberculosis is an infectious disease of world-wide occurrence. The intradermal tuberculin test is the standard test for its detection, but it can lack both sensitivity and specificity. The purpose of this study was to compare the efficiency of different complementary methods for the diagnosis of bovine tuberculosis such as macroscopic, histopathological, bacteriological analysis and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A total of 97 skin-test reactive animals were studied, and tissues and serum samples were collected from all of them at the moment of the slaughter. Seventy animals (72.16%) showed macroscopic lesions suggestive of tuberculosis. At the histopathological exam, sixty three (64.95%) presented typical granulomatous lesions. Therefore, histopathology agreed with macroscopic inspection in 92.78% of the samples. Acid-fast bacilli were observed in tissues samples from 47 (48.45%) animals, all of them also positive either at macroscopic inspection or to histopathology. In reference to the bacterial culture, only 11 (11.34%) tissues samples yielded *Mycobacterium bovis*. Thirty three (34.02%) serum samples were reactive at ELISA. Detailed visual inspection as well as histopathology, due to its high specificity, are suggested as complementary tools and may be used for confirming doubtful cases of bovine tuberculosis at the slaughterhouse.

**Keywords:** Bovine tuberculosis, macroscopic analysis, histopathological analysis, bacteriological analysis, ELISA.

### Introdução

A tuberculose é uma das mais antigas doenças infecciosas conhecidas. No bovino, é uma enfermidade infecciosa determinada pelo agente *Mycobacterium bovis*, de ocorrência

mundial, que determina prejuízos à pecuária e riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal (Lilienbaum, 2000). Constitui uma significativa causa de condenação de animais de matadouros e de mortalidade animal, resultando em grande perda econômica. Em outros

\* Depto. de Microbiologia e Parasitologia, UFF. Rua Professor Hernani Melo, 101. CEP 24210-130, Niterói – RJ, Brasil.

\*\* Depto. de Patologia e Clínica Veterinária - UFF - Niterói – RJ, Brasil.

\*\*\* Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro – RJ – UFRJ

Autor para correspondência: Walter Lilienbaum. E-mail: mipwalt@vm.uff.br

países, estima-se que as perdas econômicas decorrentes da tuberculose alcancem 10% da produtividade do gado leiteiro afetado (Kantor e Rittaco, 1994).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o rebanho bovino brasileiro está estimado em mais de 195 milhões de cabeças, e a enfermidade encontra-se disseminada em todo território nacional (IBGE, 2003). Os últimos dados oficiais de notificação de tuberculose bovina, referentes ao período de 1989 a 1998, indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados (Brasil, 2004).

Os métodos diretos de diagnóstico, baseados na visualização ou isolamento do agente etiológico a partir de lesões oriundas de animais doentes, são sem dúvida os mais confiáveis e inequívocos, sendo considerados como “padrão-ouro” de diagnóstico. No entanto, a dificuldade de obtenção de amostras *in vivo* torna pouco viável sua utilização rotineira, uma vez que é bastante complexa a obtenção de lavados bronco-alveolares em bovinos. Dessa forma a baciloscopia, cultura bacteriológica, exame macroscópico de tecidos e a histopatologia têm-se limitado ao diagnóstico *post mortem* da infecção, quando são possíveis a necrópsia e a colheita de amostras confiáveis. Assim, o diagnóstico da infecção em bovinos *in vivo* tende a ser realizado através de métodos indiretos, notadamente os testes imunológicos baseados na resposta mediada por células, como a intradermoreação (Lilenbaum, 2000).

Embora as infecções micobacterianas determinem primariamente o aparecimento de resposta imune de natureza predominantemente celular, também há resposta humoral envolvida durante o processo, especialmente quando a doença se encontra em fase mais adiantada. Um teste sorológico com boa sensibilidade e especificidade capaz de detectar anticorpos para *M. bovis* em bovinos expostos à doença seria muito útil como uma ferramenta complementar ao teste intradérmico (Adams, 2001).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído em 2004 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), determina como método padrão de diagnóstico da tuberculose bovina no Brasil a tuberculinização intradérmica. O controle da enfermidade se baseia no método teste-e-abate, isto é, no diagnóstico dos animais reativos e envio a matadouros sanitários, onde um grupo de médicos veterinários examina as lesões da carcaça e avalia quanto ao seu destino (Brasil, 2004).

No entanto, os testes intradérmicos não são 100% específicos (Wood et al., 1991; Monhagan, 1994), e a ocorrência de reações falso-positivas, com o abate desnecessário do animal, muitas vezes coloca em risco a credibilidade de todo o programa de controle. Assim, a confirmação de animais reativos através de outros métodos muitas vezes se torna necessária para garantir a confiabilidade do diagnóstico.

O presente estudo teve por objetivo estudar comparativamente a eficácia de diferentes métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em nosso meio, como os exames macroscópico de tecidos, histológico, bacteriológico e sorológico, em animais reagentes à tuberculinização e encaminhados ao abate sanitário.

## Metodologia

**Animais** – Entre os anos de 2003 e 2004 foram estudados 97 bovinos encaminhados ao abate sanitário em matadouros localizados no estado do Rio de Janeiro. O grupo de animais estudados se caracterizou por bovinos mestiços, de ambos os sexos (em sua maioria, fêmeas), com idade superior a 36 meses e de oito propriedades de exploração leiteira de quatro municípios das regiões Norte e Noroeste do estado do Rio de Janeiro. Todos os animais eram reagentes à prova de tuberculinização intradérmica comparativa, realizada por veterinários de campo credenciados pelo MAPA e conforme recomendações do PNCEBT (Brasil, 2004).

**Amostras de tecido** – Durante a inspeção macroscópica realizada de acordo com as normas vigentes no Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (Brasil, 1962), foram colhidas amostras de tecidos principalmente de pulmões, fígados, linfonodos retrofaríngeos direito e esquerdo, mediastinais anterior e posterior, traqueobrônquico, pré-escapular, apical e hepático. As amostras eram colhidas independentemente de apresentarem lesão macroscópica sugestiva de tuberculose, segundo o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (Brasil, 1994). As amostras foram divididas em duas frações, sendo uma acondicionada em frasco contendo formol salina tamponado a 4% (Prophet et al., 1994) durante 24 a 48 horas para posterior exame histopatológico, e outra congelada até o momento do processamento bacteriológico conforme recomendado no Manual de Bacteriologia da Tuberculose (Brasil, 1994).

**Amostras de sangue** – De todos os animais foram colhidas amostras de sangue sem anticoagulante no momento da sangria. Os tubos com sangue foram identificados, centrifugados a 1600 rpm durante 20 minutos e então o soro foi armazenado em alíquotas de dois mililitros em criotubos a -20°C para posterior realização da prova sorológica (ELISA).

**Testes** – As frações de tecido destinadas ao exame histológico foram clivadas, processadas e incluídas em parafina, tendo sido empregada a coloração de hematoxilina-eosina (HE) (Prophet et al., 1994). Em cada amostra de tecido destinada ao exame bacteriológico seguiu-se o protocolo segundo o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (Brasil, 1994), submetendo as amostras à descontaminação pelo método de Petroff e sementeira em meio de Lowenstein-Jensen enriquecido com piruvato. O sedimento foi ainda corado pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) e examinado sob microscopia comum (Brasil, 1994). O teste de ELISA foi realizado segundo protocolo previamente padronizado (Lilenbaum, 1999), porém utilizando como antígeno derivado protéico purificado (PPD) bovino especialmente preparado pelo Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/MG) com reduzida concentração de fenol como conservante (0,02%), a fim de não prejudicar a imunogenicidade do preparado.

## Resultados e discussão

Após detalhada análise macroscópica de vários órgãos de cada animal, verificou-se que do total de animais examinados, 70 (72,16%) apresentaram algum tipo de lesão macroscópica sugestiva de tuberculose no momento da inspeção visual

realizada durante o abate sanitário. Esta taxa é superior aos achados reportados em estudos anteriores por Corner et al. (1990), que relataram 52% em abate regular na Austrália e por Pinto et al. (2004), que verificaram lesões em 44% dos animais tuberculina-positivos durante necrópsia detalhada. Acredita-se que a alta sensibilidade desta inspeção visual se deva à possibilidade de execução de um exame macroscópico bastante detalhado durante o abate sanitário, uma vez que este tipo de procedimento permite o exame minucioso a fim de localizar as lesões sugestivas em vários órgãos dos animais abatidos. Considerando-se que 58% dos animais infectados apresentam lesões únicas (Corner et al., 1990), em um estudo mais minucioso, como o que pode ser realizado durante um abate sanitário, a probabilidade destas virem a ser visualizadas aumenta bastante, elevando desta forma a taxa de animais positivos à inspeção visual.

No que se refere ao exame histopatológico, 63 (64,95%) animais apresentaram lesão granulomatosa característica quando corados pela HE, sendo todas estas associadas à presença de lesões macroscópicas. Apesar de bastante superior ao encontrado por Pinto et al. (2004), de 18%, este não foi um achado inesperado, uma vez que a totalidade dos animais examinados era reativa aos testes intradérmicos e provinha de rebanhos com histórico de tuberculose. Em sete animais (10%) as lesões macroscopicamente semelhantes à tuberculose não se confirmaram no exame histopatológico. Esta diferença pode ser compreendida pela ocorrência de lesões granulomatosas determinadas por outras etiologias, com características macroscópicas indiferenciáveis da tuberculose (Kantor et al., 1981). A real etiologia e prevalência destas lesões granulomatosas não-tuberculosas, embora não tenham sido avaliadas no presente estudo, requerem mais ampla atenção por representarem motivo de condenação desnecessária de carcaças e muitas vezes induzirem ao erro durante os procedimentos de inspeção.

Os índices de sensibilidade dos diferentes métodos complementares utilizados no presente estudo se encontram resumidos na Tabela 1. Uma vez que se estudaram apenas animais com diagnóstico de tuberculose previamente estabelecido pelo método da intradermoreação, conforme recomendação oficial (Brasil, 2004), não foi calculada a especificidade dos diferentes métodos. Ao avaliar-se, entretanto, o exame histopatológico frente à avaliação macroscópica, este apresentou sensibilidade de 90% e especificidade de 100%. Este índice de sensibilidade foi bastante superior aos relatados por Pinto et al. (2004), de 19% e por Tabosa et al. (2000), de 16%. Acredita-se que boa parte deste sucesso alcançado pela análise histopatológica deva-se à adequada colheita de amostras, realizada por pessoal familiarizado e treinado para reconhecer lesões sugestivas da tuberculose bovina. A especificidade do teste histopatológico em relação ao exame macroscópico verificada no presente estudo concordou com a relatada por Pinto et al. (2004).

No que se refere à baciloscopia das amostras, 47 (48,94%) foram positivas, isto é, apresentaram BAAR visíveis à microscopia. Todas apresentavam lesões compatíveis com tuberculose tanto na inspeção visual realizada

durante o abate quanto no exame histopatológico. Este índice foi semelhante ao relatado por Pinto et al. (2002) que encontraram BAAR em 50% das amostras e superior ao observado por Tabosa et al. (2000) que verificaram a presença dos bacilos em apenas 7% das amostras. Embora a baciloscopia seja um exame básico no diagnóstico da tuberculose humana, sobretudo quando realizada a partir do escarro, esta não é tão sensível no diagnóstico da doença em bovinos, pois os bacilos muitas vezes não são visualizados na amostra, mesmo na presença de lesões. Assim considera-se que para se obter um resultado positivo é necessário que a amostra tenha no mínimo 10<sup>5</sup> bacilos/mL (Brasil, 1994). A ausência de BAAR em amostras positivas ao exame histopatológico já foi relatada em estudos anteriores, tanto em tecidos com cultura positiva quanto negativa, indicando, assim, pequena quantidade de bacilos na lesão (Andrade, Riet-Correa e Miekle, 1991; Tabosa et al., 2000).

Desta forma, do total de amostras testadas, 74 (76,29%) apresentaram resultados concordantes nos três testes descritos, i.e., avaliação macroscópica da lesão durante a inspeção, exame histopatológico (HE) e baciloscopia direta das lesões (ZN). Observa-se que estes três métodos são bastante rápidos e de baixo custo, tendo apresentado excelente concordância entre si (Tabela 2), constituindo-se, portanto, em boas opções para o diagnóstico complementar da tuberculose bovina. Com relação à cultura bacteriológica, foram isolados *M. bovis* em apenas 11 amostras, o que reflete sensibilidade de 11,34% para este método. Destes animais, oito bovinos também foram positivos nos exames macroscópico, histopatológico e na baciloscopia.

No que se refere aos testes mais complexos, que requerem laboratórios especializados e apresentam mais alto custo, foi avaliada a cultura bacteriológica como padrão-ouro e o teste sorológico de ELISA, utilizando PPD bovina como antígeno. O ELISA identificou 33 (34,02%) animais positivos, com 36 (37,11%) amostras com resultados concordantes aos do exame histopatológico e da baciloscopia. Este índice foi inferior ao encontrado em estudos anteriores. Ritacco et al. (1987) descreveram 90% de sensibilidade, enquanto Delgado

**Tabela 1:** Índices de sensibilidade de testes complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em 97 animais reagentes à tuberculinização\*

Teste	Sensibilidade %
Macroscopia	72,16
Histopatológico	64,95
Baciloscopia	48,94
Cultura	11,34
ELISA	34,02

\*Em relação ao teste intradérmico com PPD bovino, conforme PNCEBT.

**Tabela 2:** Resultados concordantes entre testes complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em 97 animais reagentes à tuberculinização

Teste*	Macroscopia	Histopatológico	Baciloscopia	Cultura	ELISA
Macroscopia	-	90	74	32	36
Histopatológico	90	-	81	38	45
Baciloscopia	74	81	-	35	55
Cultura	32	38	35	-	58
ELISA	36	45	55	58	-

\*Expresso em número de animais com testes positivos.

e González (2000), Lilenbaum et al. (1999) e Silva (2001) relataram 69,81%, 86,7% e 47%, respectivamente. Uma provável explicação para esta diferença pode ser encontrada no momento da colheita das amostras no presente estudo. Sabe-se que a aplicação intradérmica de PPD de origem bovina determina uma reação imune de tal magnitude que causa uma redução posterior da habilidade reativa do animal, fenômeno amplamente conhecido como dessensibilização (Monaghan, 1994). Por este motivo, repetições de testes intradérmicos devem aguardar um intervalo mínimo de 60 dias para sua realização (Brasil, 2004). No presente estudo, os animais haviam sido identificados como reativos pelas provas intradérmicas em intervalos variando entre 12-35 dias previamente ao abate. Uma vez que as amostras sanguíneas foram colhidas durante o abate, portanto em período inferior a 60 dias desde a última injeção intradérmica de PPD bovino, acredita-se ter ocorrido uma dessensibilização que explicaria o baixo título de anticorpos encontrados no soro desses animais e a baixa sensibilidade verificada para este teste. Em todos os estudos conduzidos a campo para avaliação do uso de ELISA como ferramenta complementar de diagnóstico da tuberculose bovina, os autores se preocuparam em informar que a colheita das amostras era realizada momentos antes da injeção do antígeno (Lilenbaum et al., 1999). Desta forma, apesar de serem importantes ferramentas complementares para o diagnóstico a campo da tuberculose bovina, os testes sorológicos como ELISA não devem ser recomendados como testes complementares em amostras colhidas durante o abate de animais previamente reagentes à tuberculinização.

A impossibilidade de isolamento de micobactérias verificada em 89% das amostras de animais reagentes à tuberculinização com lesões típicas ou sugestivas de tuberculose pode estar associada ao baixo número de *M. bovis* nas lesões no momento da colheita de amostras ou ainda a dificuldades inerentes ao isolamento do agente eventualmente presente nas amostras devido ao alto grau de contaminação destas durante a colheita do material. A baixa sensibilidade verificada para a cultura já foi reportada. Segundo Brown e Neuman (1979); Balian et al. (1997) e Pinto et al. (2002), a ausência de micobactérias em análises e lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose pode estar associada a três fatores: deficiência do método de isolamento com morte na descontaminação ou dificuldade de se multiplicar no cultivo; morte da micobactéria após promover a lesão, pela defesa do próprio organismo; lesão causada por

outro microrganismo. No entanto, cabe ressaltar que, uma vez isolada e identificada a amostra como *M. bovis*, este teste é indubitável, uma vez que constitui o padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose bovina e apresenta 100% de especificidade. Assim, amostras oriundas de rebanhos em que existam dúvidas quanto à origem das lesões verificadas ao abate devem sempre ser confirmadas pela cultura bacteriológica.

No presente estudo, uma vez que 47 amostras apresentaram-se positivas à baciloscopia e lesões características de tuberculose, um maior número de isolamentos de *M. bovis* era esperado. Acredita-se que a baixa sensibilidade da cultura bacteriológica no presente estudo se deve às técnicas de descontaminação empregadas no processamento das amostras. Uma vez que todas as lesões haviam sido expostas para exame visual no matadouro, uma etapa de descontaminação rigorosa pelo método de Petroff se mostrou necessária, o que sem dúvida deve ter contribuído para a morte bacilar e conseqüente baixo índice de isolamento bacteriano, em especial em amostras paucibacilares. Uma vez que tal tipo de limitação é uma constante na colheita de amostras durante o abate sanitário, considera-se que a cultura bacteriológica, apesar de constituir-se no padrão-ouro de diagnóstico, com 100% de especificidade, não deve ser recomendado como prova complementar rotineira para o diagnóstico da tuberculose bovina.

Em conclusão, o diagnóstico confirmatório da tuberculose bovina no matadouro, em casos onde parece haver dúvida quanto à especificidade das provas intradérmicas, pode ser realizada com alternativas de baixo custo, como a cuidadosa inspeção visual durante o abate sanitário ou a baciloscopia para visualização de BAAR. Ambas as alternativas apresentam baixo custo e podem ser implementadas em matadouros mediante o treinamento específico do pessoal. O exame histopatológico das lesões, embora requeira pessoal e laboratórios especializados, permite a confirmação da presença da lesão granulomatosa característica na maioria dos casos duvidosos de lesões sugestivas de tuberculose. Alternativas mais complexas, como ELISA e a cultura bacteriológica, além de apresentarem desvantagens quanto ao tempo de realização, custo e necessidade de laboratório especializado, não apresentaram vantagens significativas que justifiquem sua adoção como métodos complementares de diagnóstico da tuberculose bovina em animais reativos à tuberculinização.

## Agradecimentos

O presente estudo contou com suporte da CAPES, CNPq, FLAP e FAPERJ. Os autores agradecem o apoio dos Drs. Rafael Duarte, Marcio Alonso de Resende e Paulo Barros (MAPA), Profs. Drs. Zander Barreto Miranda e Dra. Patrícia dos Santos Araújo – PIB IC (UFF), Dra. Andréa Alencar (LARA-MG) e Marlei Gomes da Silva (UFRJ).

## Referências

ADAMS, L.G. *In vivo* and *in vitro* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 20, n. 1, p. 304-324, 2001.

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P.V. Estudos histológicos e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 11, n. 3-4, p. 81-86, 1991.

BALIAN, S.C.; RIBEIRO, P.; VASCONCELLOS, S.A.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA-NETO, J. S.; GUERRA, L. Linfadenites tuberculoides em suínos abatidos no Estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. *Rev. Saúde Pub.*, v. 31, n. 4, p. 391-397, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Brasília, p. 44-45, 1962.

- BRASIL, Ministério da Saúde. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994. 115 p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 12 out. 2008.
- BROWN, J.; NEUMAN, M.A. Lesions of swine lymphonodes as a diagnostic test to determine mycobacterial infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 37, n. 4, p. 740-743, 1979.
- CORNER, L.A.; MELVILLE, L.; SMALL, K.J.; McCORMICK, B.S.; WOOD, P.R.; ROTHEL, J.S. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Austr. Vet. J.*, v. 67, n. 11, p. 389-392, 1990.
- DELGADO, A.C.; GONZÁLES, A.S. Evaluación de la prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Rev. Invest. Vet. Perú*, v. 11, n. 2, p. 132-139, 2000.
- KANTOR, I.N.; DE LA VEJA, E.; CABALLERO, P. Estudio de órganos bovinos decomisados por tuberculose, mataderos del gran Buenos Aires. *Rev. Med. Vet.*, v. 62, n. 4, p. 282-285, 1981.
- KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the caribbean: Current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.*, v. 40, n.1-2, p. 5-14, 1994.
- LILENBAUM, W. O uso de ELISA para o diagnóstico da tuberculose bovina no Brasil: uma possibilidade interessante? *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 21, n.1, p. 28-31, 1999.
- LILENBAUM, W., SCHETTINI, J.C., FERREIRA, M.A.S., SOUZA, G.N., RIBEIRO, E.R., MOREIRA, E.C., FONSECA, L.S. Evaluation of an ELISA - PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Res. Vet. Sci.*, n. 66, p. 191-195, 1999.
- LILENBAUM, W. Atualização em Tuberculose Bovina. Uma minirrevisão. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 22, n. 4, p.145-151, 2000.
- MONAGHAN, M.L., DOHERTY, M.L., COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The Tuberculin test. *Vet. Microbiol.* v. 40, n.1-2, p. 111-124, 1994.
- PINTO, P.S.A.; FARIA, J.E.; VILORIA, M.I.V.; BEVILACQUA, P.D. Exame microbiológico da Tuberculose como subsídio à inspeção *post-mortem* de bovinos. *Rev. Bras. Saúde e Produtos Animais*, v. 3, n. 1, p. 10-15, 2002.
- PINTO, P.S.A.; VILORIA, M.I.V.; FARIA, J.E. Avaliação do desempenho dos exames anatomopatológico e histopatológico na inspeção *post mortem* de bovinos suspeitos ou reagentes à prova de tuberculinização. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, v. 11, n. 1, p. 27-31, 2004.
- PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL. Rio de Janeiro: IBGE, v. 30, p. 1-33, 2003.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B., ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington DC: American Registry of Pathology, 1994.
- RITACCO, V. KANTOR, I.N.; BARRERA, L.; NADER, A.; BERNARDELLI, A.; TORREA, G.; ERRICO, F.; FLIESS, E. Assessment of the sensitivity and specificity of ELISA for the detection of Mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. *J. Vet. Med. series B*, v. 34, p.119-125, 1987.
- SILVA, E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*, v. 78, p. 111-117, 2001.
- TABOSA, I.M.; TRINDADE, V.M.; VALE, G.M.G.; DANTAS, A.F.M.; VIEIRA, J.M.; MEDEIROS, M.B.A.; AZEVEDO, E.O.; MELO, M.A.; ANDRADE, M.G.; SOUZA, S.B.; MEDEIROS, L.S.; RODRIGUES, R.D.; XAVIER, S.D. Ocorrência de tuberculose em bovinos abatidos no matadouro municipal de Patos – PB – Brasil. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, v. 7, n.1, p. 61-62, 2000.
- WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; BALDOCK, C.; JONES, S.L.; COUSINS, D.B.; McCORMICK, B.S.; FRANCIS, B.R.; CREEPER, J.; TWEEDLE, N.E. Field comparison of the gamma-interferon assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Austr. Vet. J.*, v. 68, n. 9, p. 286-290, 1991.