

T636.089 69

L864a

2003



LUCIANO BASTOS LOPES

**AVALIAÇÃO DO TESTE BOVIGAM™ NA DOSAGEM DE INTERFERON
GAMA PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

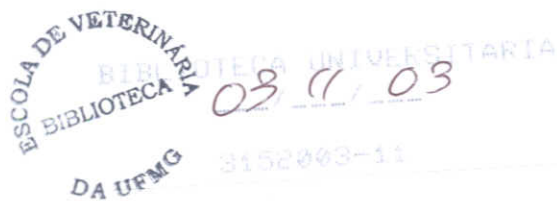
Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2003

L864a Lopes, Luciano Bastos, 1974-
Avaliação do teste BovigamTM na dosagem de interferon gama para diagnóstico da tuberculose
bovina / Luciano Bastos Lopes. - 2003.
27 p. : il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Bibliografia: p.

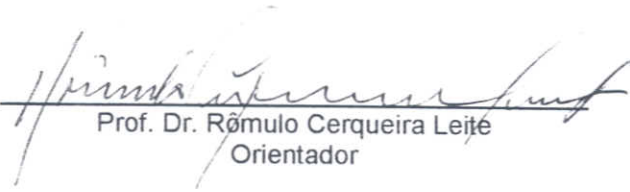
1-Bovino - Doenças - Teses. 2. Tuberculose em bovino - Diagnóstico - Teses. 3. Interferon -
Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.

CDD – 636.208 969 95




0357-81860

Dissertação defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2003 pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite
Orientador


Prof. Dr. Andrey Pereira Lage


Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato


Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto


Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

Dedico este trabalho ao meu pai que infelizmente não pode mais estar ao meu lado neste momento tão importante da minha vida. Agradeço a ele pelo exemplo de vida, que ao lado de minha mãe, mostrou à todos o que um homem determinado pode fazer para criar os filhos com tanta dignidade, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite pela amizade e incentivo, pela confiança depositada em mim e apoio em um dos momentos mais difíceis da minha vida. Sou eternamente grato pela oportunidade que me foi concedida.

Ao professor Andrey Pereira Lage pela coorientação durante a realização do projeto.

Ao Pedro Moacir P. C. Mota e ao LARA, Pedro Leopoldo – MG, pelo apoio e fornecimento das tuberculinas.

À minha mãe pelo incentivo e dedicação por todos estes anos.

Aos meus irmãos e a toda minha família pelo apoio e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Às funcionárias do Colegiado de Pós Graduação.

Aos colegas do laboratório pelo apoio durante a realização das tarefas, em especial, Telma M. Alves e Paula A. da Graça Moraes pelos finais de semana perdidos e a Ana Paula R. Stynen pelo auxílio com os testes de ELISA.

Aos colegas da graduação pela ajuda nas atividades de campo, em especial: Pedro Motta, Bruno Reis e Eduardo Bastianetto.

Aos colegas de pós-graduação pelo incentivo e apoio, em especial: Milene Alvarenga, Marcelo Camargos e Fabrício Amaral.

À Deus por ter me dado a chance de realizar um sonho.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	09
2.	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	11
3.	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1.	ANIMAIS	15
3.2.	TUBERCULINIZAÇÃO COMPARADA	16
3.3.	AMOSTRAS DE SANGUE	16
3.4.	TESTE DO INTERFERON GAMA	17
3.4.1.	INTERPRETAÇÃO DO TESTE	17
3.4.2.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.	CONCLUSÕES	22
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Interpretação dos resultados para o diagnóstico da tuberculose bovina segundo o teste de interferon gama	17
Tabela 2	Total de animais testados segundo os testes de interferon gama e tuberculinização	19

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂. Gás Carbônico

ELISA. (*Enzime Linked Immunosorbent Assay*)

G. Gravidade

IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária

INF γ . Interferon Gama

κ . Kappa

M. bovis. Mycobacterium bovis

μ l. Microlitro

OIE. Escritório Internacional de Epzootias (*Office International Epzooties*)

PBS. Solução salina tamponada (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR. Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PNCEBT. Programa Nacional de Erradicação da Brucelose e Tuberculose

PPD. Derivado protéico purificado (*Purified Protein Derivate*)

UI. Unidades internacionais

RESUMO

Este trabalho demonstra a concordância existente entre o teste do interferon gama (INF γ) e a tuberculização intradérmica comparada no diagnóstico da tuberculose bovina em condições brasileiras. Cento e dois animais provenientes de quatro rebanhos leiteiros no estado de Minas Gerais foram tuberculizados e os resultados obtidos foram então comparados com o teste de interferon gama. Para detecção do INF γ utilizou-se um *kit* comercial de ELISA, BOVIGAM™. Os resultados demonstraram não haver diferenças significativas entre as frequências de animais positivos e negativos segundo os testes de tuberculização intradérmica comparada e o teste de interferon gama no dia zero e após decorridas 72 horas da inoculação de tuberculina. A concordância entre os testes variou de 79,4 % a 85,3 % segundo o teste de Kappa. Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores médios das densidades óticas entre os dois dias de coleta.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*, tuberculose bovina, interferon gama, tuberculização intradérmica.

ABSTRACT

This paper show the agreement between the gamma interferon test (INF γ) and the comparative skin tuberculin test on the bovine tuberculosis diagnosis under field trials in Brazil. A total of one hundred and two animals from four dairy herds in the State of Minas Gerais were tuberculin tested and the results were compared with the gamma interferon test. The commercial kit of ELISA, BOVIGAM™ was used to detection of INF γ . There are no statistical differences between the frequencies of positives and negatives animals skin tested and gamma interferon tested in the first day and 72 hours after tuberculin inoculation. The agreement between both tests had varied 79.4% and 85.3% in accordance with kappa test. The values of optic densities observed at the second day were significant lower than the first day.

Key words: *Mycobacterium bovis*, bovine tuberculosis, gamma interferon, tuberculin test.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium bovis*, é uma zoonose de distribuição mundial. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões nodulares e por ser uma doença de evolução crônica.

A introdução do agente em um rebanho ocorre na maioria das vezes pela aquisição de animais infectados, propagando-se aos outros indivíduos principalmente pela inalação de aerossóis independentemente da raça, sexo ou idade, no entanto a infecção também pode ocorrer pela ingestão de material contaminado. A estabulação proporciona um contato estreito e freqüente entre os animais, o que contribui para que a enfermidade se propague com maior rapidez.

No início do século XX, obteve-se a primeira prova definitiva da transmissão da tuberculose bovina ao homem decorrente da ingestão de alimentos, principalmente pelo leite sem pasteurização.

Em 1908, Mantoux instituiu o teste alérgico para diagnóstico da tuberculose bovina através da inoculação intradérmica da tuberculina de Koch (*old tuberculin*). Em 1934, Dorset descreveu um novo tipo de tuberculina produzida em meio sintético sem os inconvenientes apresentados pela presença de proteínas heterólogas da tuberculina de Koch.

Atualmente a tuberculina utilizada para diagnóstico da tuberculose bovina é

conhecida como PPD (*purified protein derivate*). As proteínas são separadas em meio de cultura sintético e purificadas por lavagens com ácidos e fosfatos.

Além de sua importância como zoonose, a tuberculose bovina acarreta vários prejuízos como queda na produção de leite, perda de peso dos animais, descarte involuntário, morte de animais acometidos e comprometimento parcial, ou mesmo total, de carcaças nos abatedouros. Outra consequência comum é a perda de credibilidade da propriedade, mesmo após a erradicação da doença.

A tuberculose bovina ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, já que nos países desenvolvidos, os programas de erradicação iniciaram-se há várias décadas. No Brasil, a inexistência de políticas de controle eficientes contribuíram para disseminação da doença por todo o país.

Trabalhando com dados parciais, o Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento apontou, em 1996, a presença de Tuberculose Bovina em 551 propriedades no país computando 2.307 animais positivos, números maiores quando comparados aos de 1995. Os dados no entanto não refletem a realidade, já que nem todos os criadores testam os animais ou comunicam a existência da doença, que é de notificação obrigatória.

Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que 1% dos bovinos

brasileiros estão contaminados com o *Mycobacterium bovis* e 5% das fazendas do país abrigam a doença em seu plantel.

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), responsável pela saúde animal no estado de Minas Gerais, realizou no ano de 1999 um levantamento da situação da tuberculose bovina visando à implantação de um programa de controle desta doença. de acordo com o trabalho realizado no Triângulo Mineiro e nas regiões do centro e sul de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, foi estimada a prevalência aparente de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo foram detectados 5% das propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que este valor subiu a 15% no universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção.

Os métodos utilizados no diagnóstico da tuberculose em bovinos podem ser divididos em diretos e indiretos. Os primeiros são os que determinam a presença no animal do agente etiológico. A bacteriologia, a histopatologia e os métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) correspondem a esta categoria. Os métodos indiretos detectam a resposta do animal ao agente etiológico. Essa resposta pode ser humoral, pela produção de anticorpos, ou celular, mediada por linfócitos e macrófagos tal como na reação de tuberculinização.

Devido à grande variabilidade de sintomas, a lenta multiplicação do *M.*

bovis e o baixo nível de anticorpos durante o período inicial de infecção, o diagnóstico clínico, histopatológico, bacteriológico e sorológico não têm sido empregados na rotina dos programas de controle. Nos casos crônicos, os sinais clínicos apresentados pelos animais acometidos incluem: fraqueza, anorexia, dispnéia, aumento dos linfonodos e tosse.

Técnicas de imunodiagnóstico *in vitro* para tuberculose vem sendo desenvolvidas de forma promissora. Um método rápido, simples e eficiente de medida indireta da imunidade celular foi desenvolvido por pesquisadores australianos. Este teste se baseia na detecção do interferon gama (INF γ) produzidos por linfócitos T provenientes de animais infectados pelo *M. bovis*. Após a incubação das amostras de sangue estimuladas com PPD bovino e aviário, o interferon gama pode ser detectado por uma prova de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) do tipo sanduíche.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o teste de interferon gama no diagnóstico da tuberculose bovina em condições brasileiras, mais especificamente no estado de Minas Gerais, comparando-o com o teste de tuberculinização comparada no dia da inoculação de PPD bovino e PPD aviário e no dia da leitura, realizada 72 horas após a inoculação das tuberculinas. O trabalho visa também avaliar a utilização do método de interferon gama de forma seriada para confirmação do diagnóstico da tuberculose bovina.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

A tuberculose bovina é uma enfermidade de evolução crônica, caracterizada pela formação de lesões do tipo granulomatoso e de aspecto nodular. A principal forma de infecção em bovinos ocorre pelas vias aéreas e as lesões encontram-se predominantemente em linfonodos mediastínicos (Mota *et al.*, 1992).

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico da tuberculose bovina nos últimos anos em função do emprego de novas biotécnicas, o seu diagnóstico tem sido baseado na detecção da imunidade celular, pois esta é a resposta imune predominante nesta infecção (Chan *et al.*, 1994, Thoen *et al.*, 1995).

A tuberculinização intradérmica comparada, teste baseado na reação de hipersensibilidade retardada empregando o derivado protéico purificado (PPD), é reconhecida e utilizada em todo o mundo por sua alta especificidade e facilidade de execução (OIE, 2000).

No entanto, o teste de tuberculinização apresenta algumas desvantagens. Em alguns rebanhos podem ocorrer reações antigênicas cruzadas com micobactérias atípicas (Pritchard, 1988). O tempo exigido para a leitura do teste (72 horas) também tem se apresentado como uma desvantagem da técnica, ao que se adiciona a necessidade de duas viagens à propriedade para sua execução.

Do ponto de vista biológico, o maior entrave da técnica é a necessidade de se esperar de 42 a 60 dias para a realização

de novo teste devido a anergia após a tuberculinização apresentada por alguns animais (Randunz & Lepper, 1985).

Wood *et al.* (1990a) desenvolveram um ensaio celular *in vitro* baseado na produção de interferon gama a partir de linfócitos sensibilizados. No grupo de animais controle, o PPD bovino não estimulou a liberação de interferon gama de forma significativa. Testes subsequentes em um grande número de animais controle confirmaram esta observação de que o PPD não induz a liberação de interferon em culturas de animais não infectados com o *Mycobacterium bovis*. No entanto, o teste de proliferação de linfócitos não era específico para interferon gama bovino, podendo ter sua especificidade diminuída pela presença de interferon α e β .

Wood *et al.* (1990b) produziram e caracterizaram anticorpos monoclonais específicos para interferon gama bovino, INF-2 e INF-9, capazes de reconhecer dois diferentes epítopos das moléculas de interferon gama bovino natural e recombinante.

Rothel *et al.* (1990) desenvolveram um teste de ELISA do tipo sanduíche, utilizando dois anticorpos monoclonais para interferon gama bovino (IFN-2 e IFN-9). Os resultados demonstraram não haver detecção de interferon α ou β pelo método de ELISA. Este teste, quando utilizado em conjunto com a cultura de sangue total, demonstrou ser sensível, rápido e de fácil execução.

Em ensaios realizados na Austrália com grande número de animais (Wood *et al.*,

1991), o teste do interferon gama apresentou maior sensibilidade (93,6%), quando comparado à tuberculinização ano-caudal (65,6%). A especificidade foi de 96,3%, o que o levou a ser o primeiro teste para o diagnóstico da tuberculose bovina aceito na Austrália após a introdução da tuberculinização em 1890 (Mylrea, 1990).

Wood *et al.* (1992) puderam comparar em um estudo realizado a campo, os testes de interferon gama, tuberculinização intradérmica simples e ELISA utilizando anticorpos contra a proteína MPB-70. Os resultados mais favoráveis foram os do ensaio com o interferon gama nos quais a sensibilidade encontrada foi de 81,8% e a especificidade de 99,1%. A tuberculinização intradérmica simples apresentou uma sensibilidade de 68,1% e especificidade de 96,7%.

Rothel *et al.* (1992) avaliaram as condições que afetam a produção de interferon gama pela cultura de sangue total. Os requisitos para uma produção ótima de interferon gama foram o uso de sangue heparinizado, incubado até o período de oito horas após a coleta. As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente antes da cultura. O período mínimo de incubação foi de dezesseis horas em estufa de CO₂ a 37° C, em atmosfera umidificada. A concentração de PPD no sangue total teve pouco efeito na produção de interferon gama se utilizado 20 µg/ml ou mais. No armazenamento do sangue total por períodos maiores que oito horas foram encontradas evidências de decréscimo na produção de interferon gama.

Este teste, além das características de rapidez, especificidade e sensibilidade, ainda possui a vantagem de poder ser realizado em intervalos curtos de tempo, pois nenhum reagente é inoculado no animal, não induzindo assim à anergia (Wood & Rothel, 1994).

Neill *et al.* (1994) detectaram pela histologia e isolamento a presença de *M. bovis* em animais considerados negativos segundo o teste de tuberculinização intradérmica comparada. Foram realizados testes para detecção de anticorpos (ELISA), proliferação de linfócitos e o teste de interferon gama. De 196 animais positivos no teste de interferon, 98 animais apresentaram resultados negativos à tuberculinização. O teste do interferon gama detectou uma resposta mais precoce se comparado ao teste de tuberculinização sendo capaz de detectar infecções recentes.

Buddle *et al.* (1994) avaliaram o desenvolvimento de patologias similares às encontradas em infecções naturais inoculando culturas de *Mycobacterium bovis* com duas doses distintas. Em separado foi utilizado um grupo com animais gestantes inoculados com altas doses de *M. bovis*. Não houve evidências conclusivas que a gestação aumenta a susceptibilidade ao *M. bovis*, no entanto, os resultados do teste do interferon gama pós-parto revelaram uma queda na resposta celular em todos os animais do grupo, retornando aos níveis encontrados no pré-parto duas a quatro semanas após o parto. Pode-se observar também que a dose administrada afetou significativamente as manifestações da doença nos animais tratados. A magnitude da resposta

celular para os três grupos não foi estatisticamente significativa. Entretanto, os níveis de interferon gama em resposta ao PPD bovino foram detectados mais cedo nos animais inoculados com altas doses de *M. bovis*. Uma resposta equivalente foi encontrada pela resposta ao PPD aviário aos 14 dias pós-inoculação. Esta reação cruzada não foi observada em animais inoculados com baixas doses de *M. bovis*. Não foram encontradas diferenças nos resultados do teste de interferon gama realizados dez dias após tuberculinização intradérmica quando comparado ao teste realizado antes da tuberculinização.

Doherty *et al.* (1995) avaliaram a redução na capacidade de resposta da tuberculinização escapular comparada após sete dias transcorridos de uma primeira inoculação de PPD bovino e aviário em animais infectados com *Mycobacterium bovis*. Foram comparados também os efeitos da inoculação de tuberculina sobre a resposta dos testes de interferon gama e proliferação de linfócitos. Os resultados demonstraram haver uma queda estatisticamente significativa da resposta em uma segunda tuberculinização e da proliferação de linfócitos *in vitro* sete dias após a inoculação, porém no teste do interferon gama não ocorreram alterações significativas.

Goff (1996) demonstrou o efeito do tratamento com dexametasona em animais tuberculosos nos resultados do teste de gama interferon dependendo do critério de avaliação. O tratamento com corticosteróides está ligado à supressão dos linfócitos T e diminuição da

produção de interferon gama, podendo levar ao aparecimento de resultados falso negativos.

Doherty *et al.* (1996) avaliaram o efeito da restrição alimentar sobre a resposta celular em bovinos infectados com *M. bovis*. Os resultados não demonstraram diferenças significativas entre os animais controle (grupo A) e dos animais submetidos a restrição alimentar (grupo B) de acordo com o teste de tuberculinização intradérmica comparada. Não foram encontradas diferenças na produção de interferon gama *in vitro* entre os grupos A e B do experimento, o mesmo ocorrendo com a magnitude da resposta da proliferação de linfócitos após a estimulação pelo PPD bovino e aviário.

Lilenbaum *et al.* (1999) compararam os métodos de tuberculinização intradérmica simples utilizando PPD bovino e o teste de interferon gama bovino. A correlação entre os testes em cada rebanho variou de 67 % a 100 %, onde a sensibilidade foi de 88,3 % para a tuberculinização intradérmica e de 100 % para o teste de interferon gama.

Llamazares *et al.* (1999) compararam o teste do interferon gama com a tuberculinização intradérmica simples em 21 rebanhos do noroeste da Espanha. Os resultados indicaram uma sensibilidade de 84,9 % no teste de interferon e 80,2 % para a tuberculinização. No entanto, o número de falsos positivos foi maior no teste de interferon gama quando comparado a tuberculinização. Quando os dois testes foram combinados o resultado da sensibilidade obteve o melhor resultado, 92,9 %. A concordância entre os dois

testes foi de 90,8 % e o valor de κ foi de 0,63.

Scacchia *et al.* (2000) analisaram os dados de 154 animais provenientes de 32 rebanhos infectados na Itália central. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 70,3 % para o teste de tuberculização intradérmica e de 91,7 % para o teste do interferon gama. A especificidade para este último teste foi de 84,3 %. O teste de interferon gama demonstrou ser significativamente mais sensível quando comparado com o teste de tuberculização.

Ameni *et al.* (2000) determinaram e compararam a sensibilidade e a especificidade entre o teste de interferon gama bovino e tuberculização intradérmica comparada em um experimento envolvendo 30 touros zebu. A sensibilidade e a especificidade encontradas no teste de tuberculização intradérmica comparada foi de 90,9 % e 100 % respectivamente, enquanto que para o teste de interferon gama a sensibilidade encontrada foi de 95,5 % e a especificidade de 87,7 %. Não houve diferença significativa entre os dois testes com relação a sensibilidade e especificidade. Foi encontrada uma correlação positiva de ($r=0,76$) entre a espessura da pele após a inoculação de PPD bovino e a densidade óptica (determinada a 650 nm) do teste de interferon gama. Por outro lado, a correlação ($r=0,47$) entre a espessura da pele pós inoculação de PPD aviária e densidade óptica do teste do interferon gama foi relativamente fraca.

Ryan *et al.* (2000) avaliaram o teste de gama interferon oito e vinte oito dias

após a tuberculização intradérmica simples. Os resultados encontrados demonstraram uma sensibilidade de 85 % e uma especificidade de 93 % para o teste de interferon gama. Foram avaliados também os resultados encontrados quando a cultura do sangue total foi realizada no dia da coleta e no dia seguinte. Os resultados encontrados não demonstraram diferenças significativas de sensibilidade e especificidade do teste. Com relação a realização do teste de interferon gama nos dias 8 e 28 após a tuberculização intradérmica, não houve diferença significativa na sensibilidade e especificidade do teste em nenhum dos dois dias avaliados.

Rhodes *et al.* (2000) avaliaram a resposta do interferon gama e da interleucina - 4 (IL - 4) em animais infectados com *M. bovis* naturalmente e experimentalmente. Os resultados encontrados demonstraram haver um aumento da produção das citocinas, interferon gama e IL - 4 pelos linfócitos T sensibilizados nos tratamentos com PPD bovina e com o antígeno ESAT- 6. O aumento da produção de interferon gama pelos linfócitos T em resposta ao estímulo do PPD bovino e do antígeno ESAT- 6, foi detectado a partir da quarta semana após a infecção mantendo sua ascensão até a sexta e oitava semanas. Já a resposta da IL - 4 induzida pelo PPD bovino foi significativamente mais tardia em comparação a resposta do interferon gama, apresentando um pico entre a sexta e oitava semana pós infecção e declinando rapidamente.

Buddle *et al.* (2001) demonstraram a viabilidade no uso do antígeno ESAT- 6

no teste do interferon gama em bovinos tuberculinizados previamente. Dois pontos de cortes distintos foram utilizados para determinar a sensibilidade e a especificidade do teste. Encontrou-se uma alta correlação (86,7 %) entre a resposta do interferon gama ao antígeno ESTA- 6 e PPD bovino em animais infectados por *M. bovis*. A utilização do ESAT- 6 aumentou consideravelmente a especificidade do teste do gama interferon, entretanto sua sensibilidade decaiu (ponto de corte maior, diferença da DO > 0,1). A sensibilidade do teste de interferon gama em resposta ao ESAT- 6 foi melhorada quando utilizou-se um ponto de corte menor (diferença da DO > 0,04), sem comprometer a sua especificidade e consequentemente diminuindo o número de animais falso positivos.

WIPPLE *et al.* (2001) demonstraram haver diferenças significativas nas densidades óticas entre as amostras tratadas com PPD bovino produzido nos Estados Unidos, onde os valores foram maiores, e o PPD australiano (CSL). Não foram encontradas diferenças entre as respostas nas amostras tratadas com o PPD aviário produzidos pelos dois países. Os valores de densidade ótica foram maiores nas amostras após 72 horas a primeira coleta efetuada imediatamente ante da tuberculinização. Os valores também foram maiores quando comparados ao grupo controle não tuberculinizado.

O interferon gama foi escolhido pois: 1. é a citoquina que predominantemente é liberada após estimulação antigênica pelos linfócitos T; 2. parecia estar envolvido na resposta imunológica para

Mycobacterium bovis; 3. era liberado em quantidades suficientes em ensaios *in vitro* para mensuração pelo método de ELISA e 4. diferentemente da Interleucina – 2, o Interferon Gamma não era aparentemente degradado durante a cultura a curto prazo (Wood, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram avaliados os dados de 102 animais provenientes de quatro rebanhos leiteiros do estado de Minas Gerais. Dentre estes animais, foram encontrados 29 animais positivos provenientes de propriedades com histórico de tuberculose bovina, onde animais positivos segundo à tuberculinização comparada já haviam sido necropsiados anteriormente com presença de lesões macroscópicas segundo os médicos veterinários responsáveis pelos rebanhos. Outros setenta e três animais foram considerados negativos segundo o teste de tuberculinização comparada, sendo estes provenientes de propriedades com histórico negativo para tuberculose bovina de acordo com os resultados de sucessivas tuberculinizações.

O material oriundo dos animais com resultados negativos à tuberculinização, provenientes de propriedades onde haviam sido encontrados animais positivos, não foi analisado pela possibilidade de interferência nos resultados finais. Os animais que apresentaram resultados inconclusivos

segundo à tuberculinização também foram desconsiderados para realização do presente trabalho pois só foi realizado um único teste de tuberculinização comparada em cada rebanho.

3.2 Tuberculinização Comparada

A tuberculinização comparada foi realizada na região da escápula, sendo 0,1 ml (2.500 UI) de PPD aviária e 0,1 ml (5.000 UI) de PPD bovina inoculados na região anterior e posterior à espinha acromiana, respectivamente. As tuberculinas bovina e aviária utilizadas foram fornecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (lote N° 001 / 02).

Foram empregadas seringas de tuberculinização com dosagens automáticas (Mc Lintock, Glasgow, Escócia). A espessura da dobra de pele antes e 72 ± 6 horas após a inoculação das tuberculinas foi medida com cutímetro de mola apropriado (Hauptner, Alemanha). As interpretações dos resultados foram baseadas nas especificações do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), sendo considerados positivos os animais em que a diferença das medidas encontradas foram maiores ou iguais a 4 mm.

3.3 Amostras de sangue

O teste de interferon gama foi realizado a partir de amostras de sangue total provenientes de duas coletas. Foram coletadas amostras imediatamente antes

da inoculação do PPD bovino e aviário para realização do teste de tuberculinização intradérmica comparada. A segunda coleta foi realizada no dia da leitura do teste de tuberculinização.

As amostras foram coletadas em tubos estéreis heparinizados (Sarstedt, Alemanha). Foram então transportadas à temperatura ambiente (20°C a 30°C) até o Laboratório de Bacteriologia Aplicada da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras de sangue foram incubadas no prazo máximo de 24 horas após a coleta.

Cada amostra de sangue foi dividida em três alíquotas de 1,5 ml e distribuídas em placas de 24 poços, perfazendo um total de 8 animais por placa. Foram então adicionados 100 µl de PPD bovino no primeiro poço, 100 µl de PPD aviário no segundo e 100 µl de PBS (0,01 M/L, Ph 7,3) no terceiro poço como controle. Após uma leve homogeneização, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 38° C em atmosfera umidificada por 24 horas conforme descrito anteriormente por Rothel *et al.* (1990).

Após centrifugação a 500 G (4°C), foram retirados 500 µl do plasma sobrenadante de cada alíquota e armazenados em tubos de microcentrífuga, identificados com o número do animal e tratamento recebido, sendo então congelados a -20° Centígrados.

3.4 Teste do interferon gama

Para a dosagem do interferon gama foi utilizado o *kit* Bovigam™ (CSL Veterinary, Austrália). As amostras foram processadas segundo as recomendações do fabricante e o ponto de corte utilizado para interpretação dos resultados seguiu a recomendação australiana (0,050 – DO, filtro de 450 nm).

3.4.1 Interpretação do teste

Do mesmo modo que no teste de tuberculinização, são possíveis três interpretações distintas de acordo com o teste de interferon gama, onde os animais podem ser classificados como: positivos, negativos e reação inespecíficas.

Foram calculadas as médias das alíquotas de sangue estimuladas pelo PBS (controle), PPD bovina e PPD aviária. Comparadas as absorvâncias das alíquotas estimuladas pelo PPD bovino e controle negativo, fornecido

junto com o *kit* de ELISA, todos os animais em que os valores da alíquota estimulada pelo PPD bovino excederam 0,050 à absorvância do controle negativo do teste de ELISA foram considerados positivos. Todos os outros animais com valores inferiores a 0,050 foram considerados negativos segundo a recomendação do fabricante (tab. 1).

As absorvâncias das alíquotas PPD bovina, aviária e PBS foram então comparadas nos animais positivos no primeiro passo. Nos animais em que a densidade óptica da PPD bovina foi superior ou igual ao PPD aviário e superior ao controle com PBS, confirmou-se a suspeita sendo estes animais considerados positivos segundo o teste de interferon gama. Se os valores de densidade óptica das alíquotas de PPD aviário superaram os de PPD bovino, estes animais eram então considerados negativos, sendo caracterizada uma reação inespecífica.

Tabela 1. Interpretação dos resultados para o diagnóstico da tuberculose bovina segundo o teste Bovigam para tuberculose bovina.

INTERFERON GAMA		INTERPRETAÇÃO
Ponto de corte: 0,050	1º Passo	PPD Bovino > Controle negativo do ELISA em 0,050
	2º Passo	Alíquota PBS < PPD Bovino > PPD Aviário
	Negativo	PPD Aviário > PPD Bovino
CONTROLES ELISA	Positivo > 0,700	Negativo < 0,130

3.4.2 Análise Estatística

Para a comparação entre os resultados do teste de interferon gama no dia zero e 72 horas pós inoculação de PPD bovino e aviário e o teste de tuberculização foi empregado o teste de MacNemar (Siegel, 1975). A concordância entre os testes foi avaliada pelo teste de Kappa (κ) segundo Smith (1994), utilizando-se o programa de computador WIN Episcopo 2.0.

A comparação entre os resultados de densidade ótica do teste de interferon gama no dia zero e no dia da leitura da tuberculização foi feita utilizando-se o teste de Wilcoxon (Siegel, 1975). Em todos os testes foram considerados $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 102 animais tuberculizados provenientes de 4 propriedades, foram selecionados 29 animais que apresentaram resultados positivos (aumento da espessura da pele $> 4,0$ mm) e 73 com resultados negativos (aumento da espessura da pele $< 1,9$ mm) após 72 horas a inoculação. Do total de 73 reações negativas, 39 animais apresentaram reações inespecíficas.

De acordo com as análises feitas pelo método de interferon gama, 40 animais apresentaram resultados positivos no dia zero (dia da inoculação de tuberculina) e 36 animais nas 72 horas após a inoculação da tuberculina (dia da

leitura do teste de tuberculização) (tab. 2).

Os animais positivos eram provenientes de propriedades com histórico de tuberculose bovina baseado no acompanhamento dos médicos veterinários responsáveis, confirmado pela presença de lesões macroscópicas após o sacrifício dos animais. Com relação aos animais negativos, estes eram provenientes de propriedades com histórico negativo, onde o acompanhamento da tuberculose é realizado há vários anos pelo método de tuberculização comparada.

Dentre os 29 animais positivos encontrados de acordo com o teste de tuberculização, 24 foram considerados positivos e 5 apresentaram resultados negativos segundo o teste de interferon gama a partir do material coletado no momento da inoculação de PPD para realização do teste. Os resultados encontrados a partir do sangue coletado no segundo dia de coleta, ou dia da leitura, pouco se alteraram quando comparados aos do primeiro dia, sendo que dos 29 animais positivos segundo a tuberculização, 25 apresentaram resultados positivos e 4 resultados negativos segundo o teste de interferon gama.

Tabela 2. Animais testados segundo os testes de interferon gama e tuberculização comparada.

Testes Realizados			
Interferon Gama		Tuberculização Comparada	
Positivos ^a	40	Positivos	29
Negativos ^a	62		
Total ^a	102	Negativos	73
Positivos ^b	36		
Negativos ^b	66		
Total ^b	102	Total	102

Momento da inoculação a - χ^2 McNemar = 4,761, p = 0,029, gl = 1

Momento da leitura b - χ^2 McNemar = 2,4, p = 0,118, gl = 1

Dos 73 animais com reações caracterizadas como negativas segundo o teste de tuberculização, 16 apresentaram resultados positivos e 57 resultados negativos segundo o teste de interferon gama realizados com as amostras provenientes do primeiro dia de coleta. Os resultados encontrados a partir das amostras do segundo dia de coleta, indicam uma redução dos casos de animais falso positivos, pois apenas 11 apresentaram resultados conflitantes entre os testes e 62 foram caracterizados como negativos em ambos os testes.

A concordância encontrada entre os testes de tuberculização e interferon gama no dia da inoculação foi de 79,4 % e o valor de κ foi de 0,546. A concordância entre os testes no dia da leitura foi de 85,3 % e o valor de κ foi de 0,663. Se os dados dos animais com reações aviárias forem retirados das análises, a concordância entre os testes passa a ser de 82,5 % no dia da inoculação ($\kappa = 0,649$) e de 85,7 % sendo o valor de κ igual a 0,713.

Segundo o teste de McNemar, não foram encontradas diferenças

significativas entre as frequências de animais positivos e negativos nos testes de tuberculização comparada e interferon gama realizado no dia da inoculação de PPD e leitura do teste de tuberculização.

Não foram encontradas diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) entre os valores médios de densidade ótica entre o dia da inoculação (INF γ bov. = 1,1671) e 72 horas após a tuberculização (INF γ bov. = 0,9482) segundo o teste de Wilcoxon (Gráfico 1).

As amostras provenientes de animais que apresentaram reações inconclusivas após a leitura da tuberculização foram desconsideradas para realização das análises. Os animais negativos oriundos de rebanhos onde havia a presença de animais positivos também não foram considerados para a realização deste trabalho. Estes animais poderiam interferir nos resultados pois, em alguns casos, infecções recentes poderiam não ser detectadas pela tuberculização além de casos onde os animais se encontram num estado de anergia.

No Brasil, este novo método poderia ser utilizado de forma seriada após a tuberculinização nos animais que apresentarem resultados positivos para confirmação do diagnóstico da tuberculose bovina. Se for utilizado como método confirmatório, haveria uma maximização da especificidade e do valor preditivo positivo do teste, proporcionando maior precisão e rapidez no diagnóstico final. Dependendo do número de animais a serem testados e da distância entre a propriedade e o laboratório mais próximo, o resultado do teste pode se conhecido entre 24 e 48 horas.

As amostras de sangue necessárias para realização do teste de interferon gama podem ser coletadas logo após a leitura do teste de tuberculinização, sendo desnecessário o período mínimo de 42 a 60 dias para confirmação destes casos como ocorre na realização de uma nova tuberculinização. Esta característica do teste reduziria a disseminação do *M. bovis* dentro de um rebanho pois proporcionaria mais agilidade na confirmação dos casos positivos e no abate de animais positivos.

Com a implantação do Programa Nacional de Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), seria viável a utilização do teste de interferon gama como teste confirmatório na certificação das propriedades livres que aderirem ao programa. As autoridades responsáveis pelo programa teriam maior segurança e agilidade para tomada de decisões em rebanhos considerados problema.

No entanto, a incubação das amostras obedecendo-se a recomendação inicial de 8 horas sugeridas por Rothel *et al.* (1992) dificultaria a realização do teste

no país. A maior parte das propriedades rurais se encontram longe dos grandes centros de pesquisa e de laboratórios capacitados para este tipo de análise, o que dificultaria a remessa de amostras ao laboratório num período inferior a 24 horas.

Segundo Whipple *et al.* (2001), os valores de densidade ótica foram maiores nas amostras 72 horas após a tuberculinização, o que possibilitaria o processamento das amostras num prazo superior ao sugerido inicialmente, podendo chegar a 30 horas. No presente trabalho, o processamento das amostras foi realizado 24 horas após a coleta do material, e de acordo com os resultados encontrados, parece não ter havido alterações na eficiência do teste de interferon gama. Segundo o teste de McNemar, não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as frequências dos resultados de tuberculinização comparada e o teste de interferon gama realizado no dia zero e 72 horas após a inoculação.

Com estes achados, pôde-se concluir que não houve interferência da tuberculinização sobre a acurácia do teste do interferon gama realizado no dia da leitura da tuberculinização.

Se comparada a concordância entre a tuberculinização e o teste do interferon gama realizado no dia da inoculação, os valores encontrados demonstram haver uma concordância aceitável segundo Smith (1994). Comparando-se os dois testes 72 horas após a tuberculinização, os valores encontrados demonstram haver uma boa concordância entre os testes (85,3 %, $\kappa = 0,663$).

Quando comparadas as concordâncias entre os testes de tuberculização e interferon gama sem a presença dos animais que apresentaram reações aviárias à tuberculização (39 animais), os valores das concordâncias encontrados são superiores aos das análises realizadas com os 102 animais negativos. Estes achados, sugerem que talvez seja interessante a revisão do ponto de corte a ser utilizado no Brasil.

Em outros países, como no caso da Nova Zelândia, o ponto de corte é superior ao utilizado pelos australianos que foi o mesmo adotado pelo presente trabalho. Estes animais com reações aviárias podem interferir nos resultados pois com a inoculação de PPD, de 10 animais positivos no dia da inoculação, apenas 6 foram considerados positivos pelo teste no dia da leitura. Aumentando-se o ponto de corte diminuíram-se o número de casos falso positivos.

Em países onde os programas de erradicação se encontram em estágios avançados, é comum o aparecimento de animais falso positivos pois há uma diminuição na prevalência da doença e diminuição do valor preditivo positivo do teste. A associação dos testes em paralelo tem um papel importante nestes casos pois, além do aumento da sensibilidade, há um aumento do valor preditivo negativo do teste. Os testes de interferon gama e tuberculização, quando associados, apresentaram maior sensibilidade, 92,9 % (Llamazares *et al.*, 1999).

Uma grande vantagem que o teste apresenta é a facilidade no transporte das amostras de sangue pois estas não

devem ser resfriadas até o seu processamento, sendo mantidas à temperatura ambiente até o momento da incubação. Para a realização do teste, as temperaturas podem variar de 4° a 37° C sem alterações significativas (Rothel *et al.*, 1992). Em um clima tropical como o do Brasil, esta característica do teste tem uma grande importância pois em algumas situações o tempo gasto entre a coleta e o processamento das amostras pode chegar a 24 horas, o que dificultaria no resfriamento durante todo o período.

Outro ponto importante a ser discutido é a detecção de animais infectados pelo teste de interferon mais precocemente quando comparado à tuberculização, possibilitando a detecção de infecções recentes dentro de um rebanho. Segundo Domingo *et al.* (1995), o teste do interferon gama é capaz de identificar animais recentemente infectados com maior precocidade em relação a tuberculização. Wood *et al.* (2001) relataram ter identificado animais infectados 14 dias pós inoculação do *M. bovis*. Segundo Neill (1994), 38 % dos animais positivos segundo o teste do interferon apresentaram resultados negativos à tuberculização.

Com a diminuição no manejo do rebanho, o estresse no qual os animais são submetidos durante agrupamento é reduzido de forma considerável pois não é necessária a realização de leitura como no teste de tuberculização. O risco de acidentes passa a ser menor com a necessidade de conter os animais uma única vez. Em alguns rebanhos, esta característica do teste passa a ter importância significativa pois os

animais são de difícil manejo e naturalmente mais estressados quando manejados em bretes e troncos de contenção. No Brasil, é comum a realização de cruzamentos entre raças européias e zebuínas para obtenção de um grau de sangue intermediário, visando uma boa produtividade mas sem perder a rusticidade e adaptação ao clima tropical. No entanto, estes animais apresentam um comportamento mais agressivo, o que dificulta a realização de testes como a tuberculização onde são necessários dois dias para sua realização. Principalmente nas pequenas propriedades, as instalações são na maioria das vezes inadequadas e a mão de obra incapacitada, o que dificulta ainda mais o manejo com os animais.

Uma limitação do teste é o seu alto custo quando comparado com a tuberculização. Em países como o Brasil que dependem da importação dos *kits* de ELISA para interferon gama bovino cotados em Dólar, esta situação se torna ainda mais limitante em consequência do câmbio e taxas de importação. No diagnóstico da tuberculose bovina feito pelo método de interferon gama, este custo deve ser quatro vezes maior quando comparado com o valor cobrado pelos médicos veterinários para realização do teste de tuberculização. No entanto, os custos podem ser amenizados se forem consideradas a redução no manejo dos animais e diminuição do risco de acidentes, melhoria na sensibilidade.

Com relação aos bubalinos, o teste também teria boa aplicabilidade em nosso país. Estes animais estão localizados principalmente na região

norte onde a criação é extensiva e muitas vezes, de difícil acesso.

6. CONCLUSÕES

O teste de interferon gama provou ser um método rápido e prático no auxílio do diagnóstico da tuberculose bovina.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados encontrados a partir das análises das amostras provenientes dos dois dias de coleta, os testes apresentaram boa concordância entre si em ambos os dias.

O processamento das amostras após 24 horas da coleta, viabilizará a utilização do teste do interferon gama em condições brasileiras.

O teste de interferon gama poderá ser utilizado de forma seriada para confirmação do diagnóstico nos rebanhos problema em uma fase mais adiantada do programa de erradicação da tuberculose bovina.

É necessária a revisão do ponto de corte do teste de interferon gama a ser utilizado no Brasil, assim como ocorre na Nova Zelândia, para que não ocorram casos de animais falso positivos.

7. REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS

- AMENI, G.; MIÖRNER, H.; ROGER, F.; TIBBO, M. Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. V. 32, p. 267-276, 2000.
- BUDDLE, B. M.; ALDWELL, F. E.; PFEFFER, G. W.; *et al.* Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle: effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune responses and distribution of lesions. *New Zealand Veterinary Journal*. V. 42, p. 167-172, 1994.
- BUDDLE, B. M.; RYAN, T. J.; POLLOCK, J. M., *et al.* Use of ESAT-6 in the interferon- γ test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Veterinary Microbiology*, V. 80, p. 37-46, 2001.
- COLLINS, J. D. Developments in the diagnosis of tuberculosis. *Irish Veterinary Journal*. V. 48, p. 149-152, 1995.
- DOHERTY, M. L.; MONAGHAM, M. L.; BASSETT, H. F.; QUINN, P. J. Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science*. V. 58, p. 217-221, 1995.
- DOHERTY, M. L.; MONAGHAM, M. L.; BASSETT, H. F.; QUINN, P. J.; DAVIS, W. C. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. V. 49, p. 307-320, 1996.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. In: Animal Health Year Book: Roma / FAO-WHO-OIE. 1994.
- GOFF, B. S. L. Effect of dexamethasone treatment of tuberculosis cattle on results of the gamma-interferon test for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. N. 53, p. 39-47, 1996.
- KEE, H. N.; ALDWELL, F. E.; WEDLOCK, D. N.; WATSON, J. D.; BUDDLE, B. M. Antigen induced interferon γ and interleukin-2 responses of cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopatology*, V. 57, p. 59-68, 1997.
- LAGE, A. P. L.; LOBATO, F. C. F.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. *Atualização em Tuberculose bovina*. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia Coordenação Preventiva, 1998.
- LANGENEGGER, J.; ANGENEGGER, C.H.; MOTA, P. M. P. C.; LEITE, R. C. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 1, n. 4, p. 145-149, 1981.
- LILENBAUM, W.; SCHTTINI, J. C.; SOUZA, G. N.; RIBEIRO, E.R.; MOREIRA, E. C.; FONSECA, L. S.

Comparison between a γ - INF assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *J. Vet. Med. B.* n. 46, p. 353-358, 1999.

LLAMAZARES, O. R. G.; MARTÍN, C. B. G.; NISTAL, D. *et al.*. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon- γ assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Veterinary Microbiology*, V. 70, p. 55-66. 1999.

MONAGHAM, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 111-124, 1994.

MOTA, P.M.P.C.; NAKAJIMA, M. Tuberculose bovina. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. Doenças dos bovinos de leite adultos. Coronel Pacheco, EMBRAPA - CNPGL, 1992. P. 96 - 122.

NEILL, S. D.; CASSIDY, J.; HANNA, J. *et al.*. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *The Veterinary Record*, V. 135, p. 134-135. 1994.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M. *Application of quantitative methods in veterinary epidemiology*. Wageningen: Wageningen Pers, 1997. 445 p.

OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 2000.

RHODES, S. G.; BUDDLE, B. M.; HEWINSON, R. G.; VORDERMEIER, H. M. Bovine tuberculosis: immune

responses in the peripheral blood and at the site of active disease. *Immunology*. V. 99, n. 2, p. 195-2002, 2000.

RHODES, S. G.; PALMER, N.; GRAHAM, A. E. *et al.*. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin - 4 in bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 9, p. 5393-5400, 2000.

ROTHEL, J. S.; CORNER, L. A.; WOOD, P. R. Bovine tuberculosis: immunodiagnosis. CSIRO. Division of Animal Health, Parkville, Australia.

ROTHEL, J. S.; JONES, S. L.; CORNER, L. A. *et al.*. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, v.67 (4), p.134-137, 1990.

ROTHEL, J. S.; JONES, S. L.; CORNER, L. A. *et al.*. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal*, v. 69, p. 1- 4, 1992.

RYAN, T. J. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.* V. 69, p. 57-61, 2000.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 1º ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 208 p.

- SCACCHIA, M.; LELLI, R.; PETRINI, A.; *et al.*. Use of innovative methods in the eradication of bovine tuberculosis. *J. Vet. Med. B.* v. 47, p. 321-327, 2000.
- TOOSI *et al.*. Mechanisms of anergy in tuberculosis. In: SHINNICK, T. M. *Tuberculosis*. Atlanta, Springer, 1996. 307 p.
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica..* McGraw do Brasil. 1975. 350 p.
- SMITH, R. D. *Veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach*. Boca Raton: CRC Press, 1994. 234 p.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. *Statistical Methods*, 7 ed., 1980. 507 p.
- TOOSI, Z.; ELLNER, J. J. Mechanisms of anergy in tuberculosis. In: SHINNICK, T. M. *Tuberculosis*. Berlin, Springer-Verlag. 1996. cap. 10, p. 221-238.
- WHIPPLE, D. L.; BOLIN, C. A.; DAVIS, A. J., *et al.*. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial γ -interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *American Journal Vet. Research.*, v. 56, n. 4, p. 415-419, 1995.
- WOOD, P. R.; CORNER, L. A.; PLACKETT, P. *et al.*. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma-interferon. *Research in Veterinary Science*, v. 49, p. 46-49, 1990a.
- WOOD, P. R.; CORNER, L. A.; ROTHEL, J. S.; RIPPER, J. L.; *et al.*. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 31, p. 71-79, 1992.
- WOOD, P. R.; CORNER, L. A.; ROTHEL, J.L. *et al.*. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, v. 68, n. 9, p. 286-290, 1991.
- WOOD, P. R.; ROTHEL, J. S. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 125-135, 1994.
- WOOD, P. R.; ROTHEL, J. S.; Mc WATERS, P. G. D. *et al.*. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. *Veterinary immunology and Immunopatology*, v. 25, p. 37-46, 1990b.