

Marcio Roberto Silva

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SÉRICA DE ADENOSINA
DEAMINASE COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO AUXILIAR DA
TUBERCULOSE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Prof. Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1998

S586d Silva, Marcio Roberto, 1973-

Determinação da atividade sérica de adenosina como método diagnóstico auxiliar da tuberculose bovina / Marcio Roberto Silva.-Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1998.

58p.:il

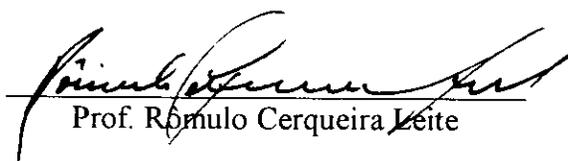
Dissertação (mestrado)

1. Tuberculose em bovino -- Diagnóstico -- Teses. 2. Bovino -- Doenças -- Teses. I. Título.

CDD-636.089 699 5

Dissertação defendida e aprovada em 02 de outubro de 1998, pela
Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Andrey Pereira Lage
Orientador


Prof. Romulo Cerqueira Leite


Prof. Francisco Carlos Faria Lobato


Prof. Vitor Salvador Picão Gonçalves


Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Aos meus pais, Aristides e Maria José, por terem me ensinado caminhos corretos para que eu pudesse atingir os meus ideais, pelo exemplo de vida que são, por terem sempre apoiado minhas decisões e comemorado com as minhas vitórias. Aos meus avós, ao tio Mauri, à tia Dorinha, à Lu, à vaninha e à madrinha Lourdes que sempre acreditaram em mim e muito me ajudaram.

Ao prof. Andrey Pereira Lage,

Meu respeito e gratidão pela orientação, confiança, amizade e apoio na realização desta dissertação. Por ser um verdadeiro mestre, que transpõe aspectos puramente técnicos para entender as intenções e o pensamento do aluno, com sensibilidade.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Andrey P. Lage, Zélia I. P. Lobato e Nelson R. S. Martins por terem me avaliado no concurso de mestrado e manifestado interesse em me orientar.

Ao professor Rômulo C. Leite e Francisco C. F. Lobato pela co-orientação, pelo direcionamento profissional e amizade de sempre.

À Escola de Veterinária da UFMG e seus professores, pela liberdade de expressão a mim concedida.

À Biokits Indústria e Comércio pela doação do "kit" diagnóstico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior – CAPES – pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, por ser ainda uma instituição de ensino *pública e gratuita* criando condições para o ingresso e a permanência de estudantes com baixo poder aquisitivo.

Ao professor José Domingos Guimarães do Departamento de Veterinária da UFV, por ser um dos verdadeiros mestres em nosso meio que além dos conhecimentos técnicos nos transmite experiências de vida.

À professora Terezinha Bhering, segundo grau de Viçosa, que me despertou para a área biológica e muito me incentivou.

À professora Iete, que me alfabetizou e participou do início da construção do meu saber.

Às pessoas simples, sobretudo aos lavradores como meu pai, que derramam seu suor e esbanjam coragem e esperança em um futuro melhor ensinando-nos a acreditar mais em nós mesmos.

Aos amigos (são tantos, prefiro não citar nomes), por sempre me encorajar a transpor os obstáculos.

À Jesus Cristo, pelos ensinamentos de fé e amor. E, juntamente à Gandhi e Marx pelos ensinamentos filosóficos que norteiam as minhas ações sociais.

"Os americanos têm olhos de brilhos penetrantes que vão fundo no que olham, mas não no próprio fundo"

Caetano Veloso

"Mestre, fazei que eu procure mais: amar que ser amado/ compreender que ser compreendido/ pois é dando que se recebe/ é perdoando que se é perdoado/ e é morrendo que se vive para a vida eterna"

São Francisco de Assis

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FIGURAS	17
RESUMO	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 LITERATURA CONSULTADA	23
2.1 Tuberculose: velha doença, novos problemas	23
2.2 Tuberculose bovina	24
2.3 Diagnóstico da tuberculose bovina	26
2.5 ADA e isozimas em fluidos biológicos: células e mecanismos envolvidos na produção da enzima	31
2.6 Uso de determinação da atividade de ADA para fins diagnósticos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Animais	37
3.2 Coleta de amostras	38
3.3 Tuberculinização Intradérmica Comparada	39

3.4 Pesquisa de ADA no soro bovino	39
3.5 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	41
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES	49
SUMMARY	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Distribuição dos animais submetidos à tuberculinização intradérmica comparada, por propriedade 37**
- Tabela 2. Valores séricos de adenosina deaminase em bovinos reagentes e não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada. 41**
- Tabela 3. Tabela de contingência de atividade sérica de ADA (ponto de corte 6,12 U/l) e tuberculinização intradérmica comparada para obtenção do grau de concordância entre os dois métodos diagnósticos 44**
- Tabela 4. Tabela de contingência de atividade sérica de ADA (ponto de corte 15 U/l) e tuberculinização intradérmica comparada para obtenção do grau de concordância entre os dois métodos diagnósticos 44**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Valores séricos de Adenosina Deaminase (U/l) entre animais não reagentes (204) e reagentes (52) à tuberculinização intradérmica comparada 42**
- Figura 2. Frequência dos valores de Adenosina Deaminase (U/l) entre os animais reagentes e não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada 43**

RESUMO

A determinação dos níveis de adenosina deaminase (ADA) no soro sanguíneo, enzima produzida principalmente por células linfóides, tem sido utilizada no diagnóstico da tuberculose humana. A atividade de ADA foi testada neste trabalho, como possível método auxiliar no diagnóstico da tuberculose bovina. Pela tuberculinização intradérmica comparada, empregando-se tuberculinas PPD bovina e aviária, foram caracterizados dois grupos: animais reagentes (n=52), provenientes de propriedades onde o *M. bovis* já havia sido isolado, e animais não reagentes (n=204), provenientes de propriedades livres de tuberculose bovina. Soros destes 256 bovinos foram submetidos à determinação de ADA, obtendo-se valores séricos de $4,45 \pm 2,33$ U/l no grupo de animais reagentes e de $6,12 \pm 4,47$ U/l naqueles não reagentes ($p=0,008$) à tuberculinização. Quando se retiraram da análise os animais não reagentes à tuberculinização da propriedade onde haviam sido confirmados casos clínicos de leucose enzoótica bovina, a média do grupo não reagente foi de $5,12 \pm 3,75$ U/l ($p=0,28$). Utilizando-se dois pontos de corte diferentes, 6,12 U/l e 15,00 U/l, não houve concordância entre os dois métodos diagnósticos na detecção de animais tuberculosos ($kappa=-0,086$ e $kappa=-0,082$, respectivamente). Pelos resultados, conclui-se que a determinação da atividade de ADA no soro de bovinos não foi um bom método auxiliar no diagnóstico da tuberculose bovina, uma vez que a dosagem da atividade de ADA no soro não permitiu distinguir animais reagentes de não reagentes à tuberculinização.

Palavras Chave: tuberculose bovina, diagnóstico, adenosina deaminase

1 INTRODUÇÃO

No mundo, o *Mycobacterium tuberculosis*, e também o *Mycobacterium bovis*, têm sido responsáveis por mais morbi-mortalidade que qualquer outro patógeno bacteriano (Daborn & Grange, 1993).

O controle e erradicação da tuberculose bovina são justificados para diminuir as restrições comerciais sobre os produtos de origem animal, pelos prejuízos potenciais causados na criação bovina e por motivos de saúde pública, devido ao fato de a tuberculose bovina constituir-se em uma importante zoonose em vários países criadores de bovinos (Kantor et al., 1993).

No Brasil, a situação da tuberculose bovina não é bem conhecida, pois não existe um levantamento que permita estimar a prevalência da doença (Mota, 1996).

O método diagnóstico de triagem usado com sucesso no controle da tuberculose bovina é a tuberculinização. Entretanto, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e a melhora dos já existentes podem auxiliar nos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina.

A adenosina deaminase (adenosina amino hidrolase - E.C.3.5.4.4. - ADA), enzima envolvida no metabolismo das purinas (Giusti e Galanti, 1984), é liberada em fluidos biológicos durante a resposta imune celular na tuberculose (L'Herminez, 1993), embora possa estar também aumentada em outros processos patológicos (Chalhoub et al., 1996). Em humanos, a detecção da atividade de ADA em diversos fluidos biológicos é usada para fins diagnósticos principalmente como método auxiliar no diagnóstico da tuberculose extrapulmonar (L'Herminez, 1993), com alta sensibilidade e especificidade (Chalhoub et al., 1996).

Rodrigues et al. (1997) dosaram a atividade de ADA em soros de bovinos objetivando estabelecer os valores séricos de normalidade desta enzima para, em estudos posteriores, averiguarem a possibilidade do uso dos valores séricos de atividade de ADA no diagnóstico da tuberculose bovina.

No presente trabalho analisou-se, por espectrofotometria a atividade sérica de ADA em bovinos reagentes e não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada como um possível método auxiliar no diagnóstico da tuberculose bovina.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Tuberculose: velha doença, novos problemas

A Organização Mundial de Saúde declarou recentemente a tuberculose como uma emergência global, pois aproximadamente um terço da população do mundo está infectada (Suffys et al., 1997). Entre 1990 e 1999, a incidência estimada de casos de tuberculose humana totalizará 88 milhões causando 30 milhões de mortes neste período (Cosivi et al., 1998).

“Se a tuberculose epidêmica continuar a ser negligenciada, futuras gerações se lembrarão desta década como uma época onde a humanidade possibilitou um agente tido como morto tornar-se resistente a drogas e incurável por toda a parte do mundo” (Suffys et al., 1997). Os avanços no diagnóstico e técnicas quimioterápicas não têm reduzido a prevalência da tuberculose em países em desenvolvimento. A epidemia de AIDS/infecção pelo HIV, as migrações e mobilidade da população humana, bem como o agravamento das condições sócio-econômicas em muitos países nos últimos 15 anos são causas que se juntam para caracterizar a tuberculose como reemergente. No Brasil a tuberculose é a segunda doença oportunista mais importante em indivíduos infectados pelo vírus HIV (Suffys et al., 1997).

Dados sobre a parcela de contribuição do *M. bovis* nos casos humanos de tuberculose são escassos tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Cosivi et al. (1998), em um trabalho de revisão, apresentam algumas taxas de contribuição do *M. bovis* na tuberculose humana, para evidenciar a sua importância. Entre 1954 e 1970 em levantamentos realizados em diversos países do mundo foi estimado que a proporção de casos humanos devidos ao *M. bovis* contribuíram para 3,1% de todas as formas de tuberculose. Na Nova Zelândia de 1983 a 1990, 7,2% do total de casos de tuberculose em humanos foram devidos ao *M.*

bovis. A tuberculose zoonótica em humanos tem sido confirmada em países africanos com taxas de até 6,4%. No Egito nove de vinte pacientes com peritonite tuberculosa selecionados ao acaso estavam infectados com *M. bovis*, o restante por *M. tuberculosis*. Na América Latina estima-se que 2% do total de casos de tuberculose pulmonar e 8% de casos de tuberculose extrapulmonar são causados pelo *M. bovis*.

No Brasil, Corrêa & Corrêa (1974) encontraram, entre diversos casos de tuberculose humana, que 3,5% eram devidos ao *M. bovis*. Concluíram, pois, que o *M. bovis* tem seu peso na etiologia da tuberculose humana no Brasil e que, do ponto de vista preventivo, é imprescindível que o Brasil estabeleça rigorosa legislação médico-veterinária para o combate a essa importante zoonose.

A AIDS/HIV tem também modificado a epidemiologia da infecção pelo *M. bovis*, aumentando o seu risco para a saúde coletiva. Na França o agente é responsável por 1,6% dos casos de tuberculose em pacientes HIV positivos, sendo todas as amostras isoladas *resistentes a isoniazida*. Também foi notada uma disseminação homem a homem mais exacerbada do *M. bovis* oriundo de pacientes com AIDS (Cosivi et al., 1998).

A grande maioria dos casos de tuberculose bovina em humanos ocorrerá em países em desenvolvimento, em muitos dos quais as medidas de controle da tuberculose bovina são ainda insuficientes e a higiene do leite inadequada (Cosivi et al., 1998).

2.2 Tuberculose bovina

A tuberculose bovina é uma doença de distribuição mundial, sendo sua prevalência menor nos países desenvolvidos, onde se encontra em fase avançada de controle e erradicação (OPS, 1970). Os programas de controle e erradicação da tuberculose bovina implementado nestes países, juntamente com a pasteurização do leite, contribuíram para reduzir drasticamente a incidência de *M. bovis* na população humana (Cosivi et al., 1998).

Historicamente, a implantação de programas de controle da tuberculose bovina só começou quando o risco da doença para a saúde humana foi claramente estabelecido no início do século. Nos Estados Unidos da América, o reconhecimento de que 25% dos casos fatais de tuberculose humana se deviam ao *M. bovis*, levou as autoridades veterinárias a iniciarem um programa de controle da tuberculose bovina em 1917. Os conceitos errôneos expressos por Koch em 1901, minimizando o caráter zoonótico da tuberculose, justificaram que no Reino Unido uma campanha idêntica fosse adiada até 1935 (Pritchard, 1988).

No Brasil, a situação da tuberculose bovina não é bem conhecida, pois não existe um levantamento que permita estimar a prevalência da doença. Na década de 80 foram notificados ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, 7541 focos de tuberculose bovina em todo o território nacional (Brasil, 1988). A ocorrência da tuberculose bovina durante o ano de 1993 foi estimada entre 0,5 e 2,7% de animais reagentes, dependendo da região, sendo que no mesmo período a taxa de lesões tuberculosas, foi de 0,14% (Mota & Lobato, 1998). Estes dados não refletem a realidade, considerando-se que no Brasil são ordenhadas aproximadamente 20 milhões de vacas anualmente para uma produção de tuberculinas no mesmo período de um milhão de doses (Mota & Lobato, 1998). Nota-se aqui uma falta de motivação para o problema pelos médicos veterinários, criadores e autoridades sanitárias, acrescido ao fato de que não existe na prática um programa governamental específico para tuberculose bovina. Quando, por alguma razão, o criador é alertado para o problema da tuberculose, a prevalência no rebanho encontra-se frequentemente acima de 40% (Mota, 1996).

A legislação brasileira recomenda como método de controle da tuberculose bovina o teste e sacrifício dos bovinos reagentes à tuberculinização intradérmica. Entretanto, a legislação vigente não prevê a total indenização aos proprietários pelas perdas decorrentes, a participação do setor privado no controle, bem como a criação de regras claras e de incentivos para os rebanhos livres de tuberculose bovina. Dessa forma, não há um envolvimento dos pecuaristas e suas associações e da indústria pecuária no financiamento e implantação dos programas de controle.

No Brasil, como em outros países da América Latina, onde a febre aftosa está em vias de erradicação, o controle da tuberculose está se tornando prioritário devido ao seu impacto no comércio de animais e produtos de origem animal. A tuberculose, tal como a brucelose, constitui um fator limitante do desenvolvimento da produção pecuária e indústria de derivados de produtos animais, bem como da sua expansão em nível regional (Gonçalves, 1998).

2.3 Diagnóstico da tuberculose bovina

Exame clínico, anátomo-patológico e bacteriológico têm uma importância relativa no diagnóstico da tuberculose bovina. Os exames clínicos individuais são pouco práticos quando se trata de rebanho, além disso bovinos infectados com o *M. bovis* não apresentam necessariamente sinais clínicos. O diagnóstico anátomo patológico é realizado em inspeção em matadouros, sendo que sua sensibilidade e especificidade estão relacionadas ao nível de conhecimento do técnico. Os dados de inspeção podem ser utilizados para a triagem de rebanhos positivos para a tuberculose bovina. O isolamento do *M. bovis* nem sempre é possível e, além disso, o cultivo é demorado (Thoen & Bloom, 1995).

Os planos de luta contra a tuberculose bovina consistem exclusivamente em medidas de profilaxia sanitária e o seu controle depende em grande medida da eficácia de utilização de um teste: a tuberculinização (Gonçalves, 1998). Por mais de 100 anos, testes de tuberculinização tem sido usados com sucesso em várias partes do mundo para o diagnóstico da tuberculose em bovinos, possibilitando, dessa forma, a efetivação dos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina (O'Reilly, 1995). Inicialmente se empregou a tuberculina "velha de Koch", sendo substituída pela tuberculina HCSM e, logo após, pela tuberculina PPD (Monaghan et al., 1994). Posteriormente, a prova de tuberculinização ganhou em especificidade mediante a utilização da prova comparada com a tuberculina PPD bovina e a PPD aviária, diminuindo as possíveis interferências ao teste de tuberculinização causadas pela infecção por micobactérias outras que o *M. bovis* (Langenegger et al., 1981, Monaghan et al., 1994, O'Reilly, 1995). Melhoras na sua sensibilidade foram adquiridas pela mudança das amostras de *M. tuberculosis* para a amostra

AN5 de *M. bovis* na produção da PPD bovina (Monaghan et al., 1994, O'Reilly, 1995).

A tuberculinização é um método de diagnóstico da tuberculose bovina baseado na medida da resposta de hipersensibilidade retardada que acontece em animais infectados com *M. bovis* após inoculação de antígeno micobacteriano específico, a tuberculina. É um teste simples, possui boa sensibilidade (68-95%) e especificidade (96-99%) individuais e boa sensibilidade de rebanho, sendo, portanto, considerado um bom diagnóstico de rebanho (Monaghan et al. 1994). O'Reilly (1995), acrescenta que repetidos testes de tuberculinização de rebanhos infectados em intervalos não menores que 60 dias podem aumentar significativamente a sensibilidade do teste em nível de rebanho e que animais que não foram detectados em um primeiro teste ou mesmo animais recentemente infectados poderiam ser identificados em um segundo teste. Além disto, a tuberculinização pode detectar um bovino infectado desde 30 a 50 dias após infecção.

Entretanto, a tuberculinização apresenta algumas desvantagens. Alguns animais, ainda que infectados, não respondem aos testes de tuberculinização (O'Reilly, 1995). Fatores como infecção recente, final de gestação e má-nutrição podem ocasionar falso negativos à tuberculinização. Em acréscimo, animais em estado avançado de infecção podem manifestar anérgicos diminuindo a sensibilidade do teste (Monaghan et al., 1994). Após a tuberculinização, os animais apresentam sua capacidade de responder a novas tuberculinizações diminuída. A reatividade é retomada em 42 a 60 dias (Monaghan et al., 1994).

A sensibilidade e a especificidade são características inerentes aos testes diagnósticos. Já o valor preditivo positivo (VPP), medida da probabilidade que um animal com um teste positivo realmente esteja infectado com o *M. bovis*, e o valor preditivo negativo (VPN), medida da probabilidade que um animal com um teste negativo realmente esteja livre do *M. bovis*, possuem relação direta e relação inversa, respectivamente, com a prevalência da doença (O'Reilly, 1995). Quando a tuberculose bovina é erradicada de uma população, o VPP é zero e o VPN é 100%. À medida que a prevalência de animais infectados pelo *M. bovis* decresce na

população, o VPP também decresce e o problema de animais reagentes falso-positivos assume maior importância. A escolha de níveis aceitáveis de especificidade podem depender da situação epidemiológica da doença. Quando a prevalência de uma doença é baixa ou em vias de erradicação, uma boa prática quando possível é a combinação de dois ou mais métodos diagnósticos, sendo que um primeiro (mais sensível que específico) funciona como triagem proporcionando uma elevação artificial da "prevalência" no grupo selecionado pelo primeiro teste o que conduz a um aumento do VPP em um segundo teste utilizado (geralmente sensível e muito específico). Em campanhas, em fase de erradicação, onde as prevalências são muito baixas seria ideal um teste com uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 99,9% (O'Reilly, 1995).

Para que um programa de controle de tuberculose possa ser estabelecido em uma região, é necessário que técnicas de diagnóstico confiáveis e de fácil execução estejam disponíveis para a identificação dos indivíduos e das populações infectadas pelas micobactérias (L'Herminez, 1993).

O método de diagnóstico da tuberculose bovina considerado como padrão internacional continua sendo a tuberculinização intradérmica simples ou comparada, com leitura após 72 horas da inoculação (OIE, 1996). Os outros métodos de identificação de animais infectados pelo *M. bovis* são considerados como auxiliares no diagnóstico da tuberculose bovina em condições específicas.

Devido a baixa prevalência de casos clínicos de tuberculose em bovinos, em vários países que estão em fases avançadas de controle e erradicação, há uma demanda de mudanças nas diferentes bases adotadas no passado, incluindo o uso de outros testes diagnósticos muito específicos e com sensibilidade aceitável para identificação de bovinos recentemente infectados (Collins, 1995). A conjugação de testes em paralelo para melhorar a sensibilidade ou de testes em série para melhorar a especificidade tem sido propostas em outras situações. As novas necessidades impostas no controle da tuberculose bovina, entre outras as restrições comerciais crescentes, evidenciam a necessidade de controle da tuberculose bovina em países onde este ainda não é praticado por meio da

tuberculinização, e impulsionam o desenvolvimento de novos testes diagnósticos, bem como melhora nos já existentes.

Atualmente, encontram-se em etapa experimental ou de avaliação, algumas provas *in vitro*, que, determinadas sua eficácia e funcionalidade, poderão ser empregadas como provas complementares à tuberculinização, como instrumentos de vigilância epidemiológica, como confirmação de diagnóstico ou em propriedades onde não seria possível o retorno para a leitura do teste alérgico.

Devido a natureza da resposta imune de bovinos infectados com *M. bovis*, bem como o espectro clínico da doença, algumas limitações no diagnóstico da infecção pelo *M. bovis* podem ser esperadas, principalmente em diagnósticos sorológicos baseados na detecção de anticorpos (Collins, 1995), que apresentam normalmente baixa sensibilidade devido a baixa resposta imune humoral em animais em início de infecção. Entretanto experimentos mostram que detecção de anticorpos seria útil na detecção de animais em estágios avançados de infecção ou em animais anérgicos (Harboe, 1990).

Os testes que medem resposta celular "in vitro" para o *M. bovis*, embora promissores possuem também algumas desvantagens. Os testes de proliferação de linfócitos, mesmo com sua alta sensibilidade e especificidade, não se adequam à rotina do diagnóstico da tuberculose bovina, pois utilizam reagentes radioativos (Wood & Rothel, 1994). O teste de gama interferon, um ensaio "in vitro" para detectar indiretamente a resposta imune mediada por células contra antígenos de *M. bovis*, recentemente desenvolvido na Austrália, mostrou sensibilidade de 95,2% e especificidade de 96,3% (Wood & Rothel, 1994). Entretanto, este teste exige que o tempo entre coleta de amostra e execução do teste seja de, no máximo, 12 horas.

Outras novas tecnologias, como o uso de sondas de DNA para a demonstração do *M. bovis* em tecidos (Collins, 1995), bem como o uso de amplificação de DNA para a rápida identificação do *M. bovis*, estão sob investigação (Cousins et al., 1991). Estes métodos moleculares tem sido utilizados principalmente na vigilância epidemiológica da infecção pelo *M.*

bovis e possuem potencial como substituto do isolamento para a confirmação das lesões encontradas pela inspeção sanitária como devidas ao *M. bovis*.

A detecção da adenosina deaminase (ADA) tem sido utilizada, principalmente, para o diagnóstico da tuberculose em efusões pleurais humanas, com alta sensibilidade e especificidade (L'Herminez, 1993). Foi sugerido que a determinação sérica desta enzima também pudesse ser utilizada como prova complementar no diagnóstico da tuberculose bovina, pois foram encontrados níveis aumentados de ADA em soros de dez bovinos tuberculosos em relação a bovinos não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada (Rodrigues et al., 1997).

2.4 Adenosina deaminase (ADA): ação metabólica

A adenosina deaminase (adenosina amino hidrolase - E.C.3.5.4.4.- ADA) é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas, estando presente em vários tecidos dos mamíferos (Koehler & Benz, 1962). É uma enzima de média especificidade que catalisa a hidrólise de grupos amínicos, hidroxilamínicos, halogênicos e metoxílicos, ligados ao carbono 6 do núcleo púrico. Seu principal papel bioquímico é o de catalisar a transformação da adenosina em inosina, com consequente liberação de amônia (Giusti & Galanti., 1984).

A ADA é amplamente distribuída no homem, especialmente em tecidos com células linfóides, tais como linfonodos, baço e timo (Edwards et al., 1971), e participa da diferenciação de células linfóides (Barton et al., 1979 e Bothamley et al., 1995). Tanabe (1993) encontrou atividade de ADA em tecidos e células de diversas espécies animais, inclusive bovinos.

Fisiologicamente a adenosina deaminase é uma enzima necessária para o catabolismo normal da adenosina (Ammann & Fudenberg, 1980), sendo importante para o perfeito funcionamento do sistema imune. A deficiência genética desta enzima produz uma imunodeficiência combinada severa no homem (ADA-SCID), em que os níveis de células T caem para um nível visto ordinariamente só em pacientes em fases finais de AIDS (Clark, 1995).

A ADA é liberada em fluidos biológicos durante a resposta imune celular em vários processos patológicos, inclusive tuberculose. (L'Herminez, 1993). As células e os mecanismos envolvidos na liberação de ADA não estão totalmente esclarecidos (Ungerer et al., 1992; Ungerer et al., 1994).

2.5 ADA e isozimas em fluidos biológicos: células e mecanismos envolvidos na produção da enzima

A origem de ADA em lesões, bem como no soro, e o mecanismo pelo qual sua atividade está aumentada em alguns processos patológicos não estão bem esclarecidos (Ungerer et al., 1992; Ungerer et al., 1994).

A atividade de ADA é dez vezes maior em células linfocíticas que em eritrócitos e maior em linfócitos T que em linfócitos B. Varia ainda durante a diferenciação de células T, com significativos aumentos de seu nível em estados imaturos ou não diferenciados, sendo ainda relacionada à proliferação de linfócitos (Hall, 1963). Carson & Seegmiller (1976) encontraram que a inibição de ADA era acompanhada por uma restrição da blastogênese dos linfócitos.

Baganha et al. (1990) encontraram correlações positivas entre níveis de ADA e porcentagens de células T CD4⁺ em todos os exsudatos pleurais estudados. O aumento da atividade de ADA correspondia a um aumento de linfócitos T CD4⁺ em efusões tuberculosas, enquanto seu declínio estava correlacionado com um aumento da percentagem de linfócitos T CD8⁺ e queda do número de linfócitos T CD4⁺ em efusões neoplásicas. Entretanto, Ocaña et al. (1988), Ungerer et al. (1992) e Ungerer et al. (1994) não encontraram correlação entre a contagem de linfócitos e a atividade de ADA em efusões pleurais.

Ungerer et al. (1992) estudaram as isoenzimas de ADA e a natureza do aumento de ADA no soro. A ADA encontrada em eritrócitos foi ADA1, sendo esta isoenzima mais abundante em baço, linfócitos, monócitos e neutrófilos. A ADA2 só foi detectada em monócitos, os quais mostraram 82% de ADA1 e 18% de ADA2. Em todos os soros com aumento de atividade de ADA, ADA2 predominou, exceto em pacientes com leucemia linfoblástica aguda, nos quais parece ter prevalecido a produção de ADA1

pelos linfoblastos. Pelo fato de ADA2 só ter sido demonstrada em monócitos, foi assumido que a ADA2 presente no soro era originária deste tipo celular. ADA presente no soro de pacientes, especialmente ADA2, pode ser um conveniente marcador para avaliar a imunidade mediada por células.

Em efusões tuberculosas, um alto coeficiente de correlação (0,890) entre atividade de ADA total e ADA2 foi encontrado (Ungerer et al., 1994), sendo a contribuição média de atividade ADA2 à atividade total de ADA de 88%, sugerindo que a ADA em efusões pleurais tuberculosas origina de linhagem de células monócito-macrófago. Em contraste, ADA1 causou aumento de atividade ADA em efusões pleurais parainfectivas, sendo originada provavelmente da renovação de linfócitos e neutrófilos, ou ambos.

2.6 Uso de determinação da atividade de ADA para fins diagnósticos

Uma das primeiras referências a esta enzima (ADA) avaliaram seu papel no diagnóstico de câncer de pulmão (Nishihara et al., 1970).

Em 1973, Piras et al. (1973) demonstraram, pela primeira vez, aumento significativo da atividade da ADA em líquido de pacientes com meningite tuberculosa. Desde 1978, quando Piras et al. (1978) sugeriram utilização da dosagem de ADA como auxiliar no diagnóstico diferencial das efusões pleurais, determinação de ADA tem sido usada no diagnóstico de efusões pleurais tuberculosas.

Em humanos, a detecção da atividade de ADA por espectrofotometria é usada principalmente em pacientes com efusões pleurais e, em menor escala, em pacientes com efusões pericárdicas e com meningite e ascite tuberculosas (L'Herminez, 1993). A medida de atividade da adenosina deaminase (ADA) nestas efusões corporais suspeitas é uma técnica simples e altamente sensível e específica (sensibilidade > 90% e especificidade > 95%) para diagnóstico de tuberculose (Chalhoub et al., 1996).

Entretanto, um aumento de atividade de ADA está presente em várias circunstâncias em humanos: (1) em efusões pleurais, pericárdicas e peritoniais de natureza tuberculosa; (2) em efusões pleurais que acompanham artrites reumatóides e infecções linfoproliferativas e, também, em empiemas, embora com níveis usualmente menores que em tuberculose; (3) em fluido cerebrospinal, em determinadas doenças neurológicas; (4) em pacientes com leucemia linfóide aguda (Baganha et al., 1990); (5) em várias outras doenças como disfunções do fígado, febre tifóide e mononucleose infecciosa (Ungerer et al., 1992). Dessa forma, sérias dúvidas tem surgido sobre o uso de níveis de ADA no diagnóstico da tuberculose pela possibilidade de resultados inespecíficos.

Em geral, efusões pleurais malignas apresentam menor nível de ADA que os encontrados em tuberculose. Entretanto, efusões pleurais secundárias a linfomas e a leucemias estão geralmente associadas com maiores atividades de ADA que disfunções malignas, e podem ser confundidas com efusões tuberculosas pela atividade de ADA e pela taxa linfócito/neutrófilo (L/N) (Burgess et al., 1996).

No homem, a detecção dos níveis de ADA para fins diagnósticos da tuberculose em efusões pleurais, apresentou sensibilidade e especificidade de 90% e 89%, respectivamente (Burgess et al., 1995). A determinação dos níveis de ADA em fluidos pleurais mostrou-se um método rápido e acurado de diagnóstico da tuberculose. A atividade de ADA foi maior entre os pacientes com tuberculose pleural, embora condições outras também puderam estar associadas com aumento de atividade de ADA, particularmente em infecções piogênicas. Determinação dos níveis de ADA tem validade em regiões onde as prevalências de tuberculose são altas ou moderadamente altas (Burgess et al., 1995; Valdés et al., 1995; Valdés et al., 1996a). Por outro lado, é de limitado valor em áreas de baixa prevalência de tuberculose (Van Keimpema et al., 1987).

Chalhoub et al. (1996) estudaram a atividade de ADA e sua utilidade no diagnóstico diferencial de derrames pleurais em nosso meio, onde a prevalência de tuberculose em derrames pleurais é alta. Com um ponto de corte de 40 U/l de ADA, este teste apresentou sensibilidade de 93,3% e especificidade de 93,5%. Embora o teste tenha se apresentado eficiente no

diagnóstico da tuberculose pleural, os mesmos não é como substituto, mas como complementar, aos outros métodos diagnósticos existentes. Valdés et al. (1996b) analisaram as atividades de ADA total e ADA2 em fluidos pleurais objetivando clarear os mecanismos do uso diagnóstico da atividade de ADA. As eficiências entre os dois testes não foram consideradas estatisticamente diferentes, porque a alta atividade de ADA total em efusões pleurais tuberculosas são devidas em grande parte a alta atividade de ADA2.

Os estudos sobre determinação da atividade de ADA em soro de humanos com a finalidade de diagnóstico da tuberculose são escassos e os resultados não são conclusivos. O conhecimento dos mecanismos envolvidos no aumento de ADA no soro, bem como das células envolvidas poderia aumentar a utilidade diagnóstica das determinações de ADA. A determinação das isoenzimas de ADA pode ser útil para diferenciar entre a origem do aumento de ADA no soro, se de monócitos-macrófagos ou se de linfócitos-linfoblastos (Ungerer et al., 1992).

Embora aumentos dos níveis séricos de ADA foram encontrados em pacientes tuberculosos (Lakshmi et al., 1992, Rodrigues et al., 1993, Rodrigues et al., 1994 e Orphanidou et al., 1996), a sua dosagem no soro não tem validade comprovada no diagnóstico da tuberculose pleural. Lakshmi et al. (1992) encontraram uma média sensibilidade na dosagem sérica de ADA para diagnóstico da tuberculose pleural. Em contraste, Orphanidou et al. (1996) encontraram valor de sensibilidade baixo dosando ADA sérica (33%) em comparação a ADA pleural (70%) no diagnóstico da tuberculose pleural, sendo ainda constatada ausência de correlação entre os níveis de ADA no soro e no fluido pleural em todos os grupos de pacientes estudados.

Lakshmi et al. (1992) encontraram níveis médios de ADA mais elevados em pacientes que apresentavam baciloscopia positiva e/ou reação fortemente positiva à tuberculinização que em pacientes negativos à tuberculinização e baciloscopia. Estes resultados sugerem que em humanos as dosagens de ADA no soro são influenciadas pelo estágio clínico da tuberculose.

Rodrigues et al. (1993) encontraram diferenças significativas nas médias de valores séricos de ADA entre soros de indivíduos normais ($21,2 \pm 9,3$) e pacientes tuberculosos ($450 \pm 84,2$) por meio de um "kit" para detecção de ADA baseado no método colorimétrico descrito por Giusti e Galanti (1984).

A utilização dos níveis de ADA para fins diagnósticos, principalmente de tuberculose, têm sido bastante estudado no homem, sendo, em determinadas condições, utilizado na rotina clínica. Entretanto, não existem muitos relatos da utilização clínica da determinação dos níveis de ADA em medicina veterinária (Yasuda et al., 1996).

Yasuda et al. (1996) determinaram a atividade de adenosina deaminase em tecidos e soro de bovinos normais, de bovinos infectados e de bovinos com sinais clínicos de leucose enzoótica bovina. A média de ADA no soro de casos clínicos de leucose enzoótica bovina, animais infectados com o vírus da leucose enzoótica bovina (VLB) e animais sadios foi $22,8 \pm 30,1$ U/l, $3,9 \pm 1,7$ U/l e $3,9 \pm 1,9$ U/l, respectivamente. Os níveis de ADA foram maiores nos bovinos com sinais clínicos de leucose enzoótica bovina, não sendo notada diferença significativa nos níveis séricos de ADA entre os animais infectados e os não infectados pelo VLB. A diferença estatisticamente significativa nos níveis de ADA entre animais com sinais clínicos de leucose enzoótica bovina e animais sem sinais clínicos demonstra que flutuações nos níveis de ADA no soro podem depender da gravidade das manifestações clínicas apresentadas pelos animais.

Rodrigues et al. (1997), avaliaram os valores séricos de ADA em bovinos clinicamente sadios como referência de provável normalidade da atividade da ADA encontrando valores médios em 150 soros de $15,1$ U/l (desvio padrão de $6,7$ U/l). No mesmo estudo, soros de dez bovinos tuberculosos apresentaram médias de atividade de ADA significativamente maiores que aquelas apresentadas pelo grupo negativo. Entretanto, o estágio clínico dos animais tuberculosos não foi mencionado.

O presente trabalho teve por objetivo determinar a atividade da enzima adenosina deaminase (ADA) no soro de bovinos reagentes e não reagentes à prova de tuberculinização intradérmica comparada e avaliar a utilização

dos valores séricos de ADA como método auxiliar no diagnóstico da tuberculose bovina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os rebanhos bovinos, provenientes de seis propriedades produtoras de leite do Estado de Minas Gerais, com animais reagentes e/ou não reagentes à tuberculização foram sinalizados ao Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG por veterinários das regiões onde estas propriedades se encontram. Um total de trezentos e oitenta e três animais adultos destas propriedades, na sua maioria fêmeas mestiças holandês/zebu, foram submetidos a nova tuberculização intradérmica comparada em período superior a 60 dias da última tuberculização. O resultado da tuberculização dos animais destas propriedades pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos animais submetidos à tuberculização intradérmica comparada, por propriedade

Propriedades	Tuberculização ¹		Total
	Reag ²	NReag ³	
1	61	32	93
2	13	2	15
3	53	18	71
4	5 ⁴	0	5
5	104 ⁴	0	104
6	95 ⁴	0	95
Total	331 ⁴	52	383

1 - Tuberculização intradérmica comparada

2 - Reag - Animais reagentes à tuberculização intradérmica comparada

3 - NReag Animais não reagentes à tuberculização intradérmica comparada

4 - Somente os 204 animais não reagentes à tuberculização intradérmica comparada provenientes de propriedades sabidamente livres de tuberculose bovina foram utilizados na avaliação dos valores séricos de ADA no diagnóstico da tuberculose bovina.

A partir dos resultados da tuberculinização intradérmica comparada, os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo I: constituído de 52 animais reagentes à tuberculinização intradérmica comparada, provenientes de três propriedades onde o *M. bovis* fora isolado de animais com sintomas de tuberculose bovina;

Grupo II: constituído de 204 animais não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada provenientes de três rebanhos livres de tuberculose bovina.

Os 127 animais não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada provenientes de propriedades onde o *M. bovis* fora isolado foram descartados do experimento para se evitar resultados falso-negativos da tuberculinização escapular comparada.

Os animais envolvidos no estudo não foram testados para a presença de outros agentes infecciosos.

3.2 Coleta de amostras

Aproximadamente 10 ml de sangue de cada animal foram coletados em tubos com vácuo sem anticoagulante, antes da inoculação da tuberculina. O sangue coletado sem anticoagulante foi deixado em repouso por, pelo menos, duas horas para a coagulação e então transportado em temperatura ambiente até o laboratório, num período máximo de seis horas, para posterior separação do soro. Os tubos foram mantidos no laboratório a 4°C. Após a separação e a preparação de aliquotas, os soros foram conservados a -20°C até sua utilização no teste. O prazo entre a coleta e o armazenamento a -20°C sempre foi inferior a 20 horas.

Somente soros livres de hemólise foram utilizados, devida a atividade de ADA contida em eritrócitos que pode, erroneamente, elevar os resultados de ADA no soro (Giusti & Galanti, 1984).

3.3 Tuberculinização Intradérmica Comparada

Foi utilizada a tuberculinização intradérmica comparada empregando PPD bovina e PPD aviária (LARA - MAA - Pedro Leopoldo - MG) inoculadas na região escapular. A prova foi realizada e interpretada segundo as recomendações de Langenegger et al. (1981). Neste estudo a tuberculinização intradérmica comparada foi utilizada como teste de referência para as análises.

3.4 Pesquisa de ADA no soro bovino

A pesquisa da enzima ADA no soro de animais dos dois grupos foi realizada empregando-se o ADA-Kit (Biokits, Contagem - MG), segundo as recomendações do fabricante. A metodologia empregada pelo ADA-Kit é a descrita por Giusti & Galanti (1984) e modificada por Rodrigues et al. (1993). A ADA catalisa a transformação da adenosina em inosina, com conseqüente liberação de amônia. A atividade da ADA pode ser avaliada pela determinação da amônia, formada durante os 60 minutos de incubação, a 37°C. A amônia reage, em presença do catalisador nitrosilpentacianoferrato (III) de sódio, com o hipoclorito de sódio e o fenol, em meio alcalino, para formar indofenol, intensamente colorido de cor azul. A concentração da amônia é diretamente proporcional à absorvância do indofenol determinada por espectrofotometria a 650 nm (620 a 650 nm). Uma unidade de ADA é definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 micromol de amônia de adenosina por minuto em condições de ensaio padrão (Giusti & Galanti, 1984).

A estabilidade da enzima não se constitui em problema, pois ela é estável no soro por pelo menos 24 horas a 25°C, 7 dias a 4°C e 3 meses a -20°C (Ellis et al., 1970; Rodrigues et al., 1993).

3.5 Análise estatística

As médias de atividade sérica de ADA entre os grupos reagentes e não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada foram comparadas pelo teste t de Student, tomando-se $P < 0,05$ como significativo. Foi determinada a correlação entre os valores de atividade de ADA e os

resultados da tuberculização intradérmica comparada (Snedecor & Cochran, 1980).

A dispersão e a frequência dos valores séricos de ADA entre os grupos reagentes e não reagentes à tuberculização intradérmica comparada foi avaliada graficamente.

Foram estabelecidos pontos de corte dos valores séricos de ADA para detecção de animais tuberculosos e a determinação dos níveis de concordância entre os pontos de corte dos valores séricos de ADA e a tuberculização intradérmica comparada foi avaliada pela estatística Kappa (Smith, 1995).

Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os programas Epi Info (Dean et al., 1995), Minitab (Minitab for Windows, release 9.2, Minitab Inc., USA) e WinEpiscope (Frankena et al., 1990).

4 RESULTADOS

A média \pm desvio padrão, a mediana e os valores mínimo e máximo da atividade sérica de ADA (U/l) nos bovinos reagentes e não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada, bem como os valores globais apresentados pelos dois grupos são apresentados na Tabela 2:

Tabela 2. Valores séricos de adenosina deaminase em bovinos reagentes e não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada.

Tuberculinização ¹	Valores séricos de ADA (U/l)		
	Média \pm desvio padrão	Mínimo	Máximo
Reagentes (n = 52)	4,45 \pm 2,33	0,00	11,22
Não reagentes (n = 204)	6,12 \pm 4,47	0,00	23,52
Não reagentes (n = 100) ²	5,12 \pm 3,75	0,00	23,52
Total (n = 256)	5,78 \pm 4,24	0,00	23,52

¹ - Tuberculinização intradérmica comparada

² - Excluindo-se os animais da propriedade 5

Os valores de atividade de ADA não apresentaram uma distribuição normal (Gaussiana). Dessa forma, para a realização das análises estatísticas, foi realizada uma transformação logarítmica (base 10) nos valores de atividade de ADA acrescidos de uma unidade [\log_{10} (ADA+1)]. Após a transformação logarítmica, a média do grupo negativo revelou-se significativamente ($P = 0,008$) maior que a do grupo positivo à tuberculinização escapular comparada pelo teste t de Student.

Os maiores valores séricos de ADA foram encontrados em animais negativos à tuberculinização intradérmica comparada de duas propriedades livres de tuberculose bovina. Quando retiramos da análise a propriedade 5 que possuía a maior porcentagem (16,34%) de valores séricos de ADA (U/l) superiores a 11,22 (maior valor sérico de ADA

apresentado pelos bovinos positivos à tuberculinização intradérmica comparada), os resultados de média \pm desvio padrão, e os valores mínimos e máximos para o grupo negativo ($n = 100$) foram $5,12 \pm 3,75$ U/l, 0,00 U/l e 23,52 U/l, respectivamente. Após esta seleção e efetuada a transformação logarítmica, a comparação das médias não apresentou diferença significativa ($P = 0,28$) entre os grupos reagentes e não reagentes à tuberculinização escapular comparada pelo teste t de Student.

A dispersão e a frequência dos valores séricos de ADA entre os animais reagentes e não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada são mostradas na Figura 1 e na Figura 2, respectivamente.

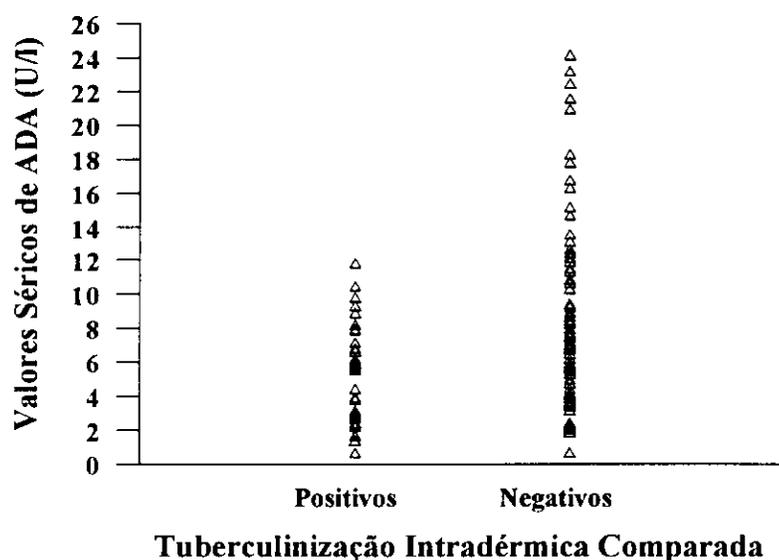


Figura 1. Valores séricos de Adenosina Deaminase (U/l) entre animais não reagentes (204) e reagentes (52) à tuberculinização intradérmica comparada

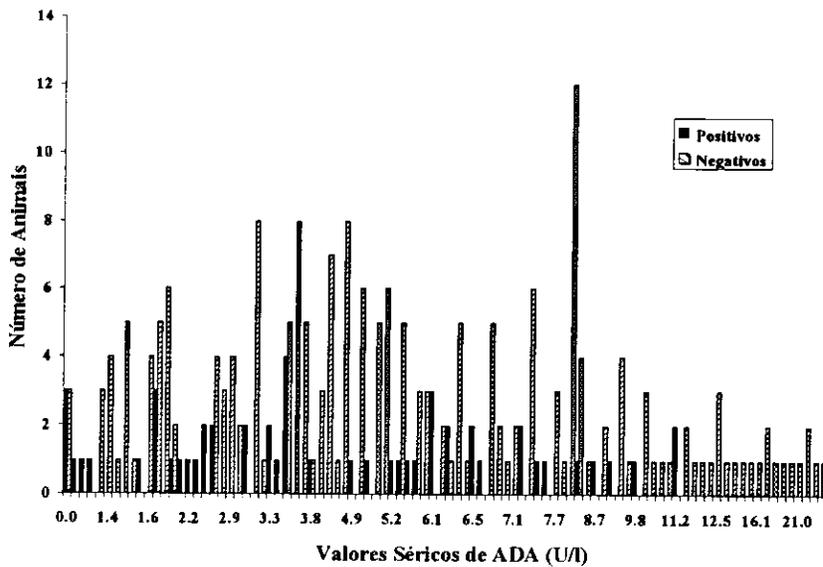


Figura 2. Frequência dos valores de Adenosina Deaminase (U/l) entre os animais reagentes e não reagentes à tuberculização intradérmica comparada

Para a avaliação dos níveis de concordância entre os dois testes diagnósticos (tuberculização intradérmica comparada e determinação sérica de ADA) foram traçados dois pontos de corte: 6,12 U/l, valor sérico médio de ADA encontrado no grupo não reagente à tuberculização intradérmica comparada no presente estudo, e 15,00 U/l, valor sérico médio de ADA encontrado por Rodrigues et al. (1997) em bovinos livres de tuberculose bovina no Estado da Bahia. Os valores de concordância (Kappa) foram -0,086 e -0,082 utilizando-se o primeiro e o segundo ponto de corte, respectivamente (Tabs. 3 e 4).

Tabela 3. Tabela de contingência de atividade sérica de ADA (ponto de corte 6,12 U/l) e tuberculização intradérmica comparada para obtenção do grau de concordância entre os dois métodos diagnósticos

ADA	Tuberculização ¹		Total
	Pos ²	Neg ³	
Pos ⁴	15	82	97
Neg ⁵	37	122	159
Total	52	204	256

1 - Tuberculização intradérmica comparada (TIC)

2- Pos - animais reagentes à TIC

3 - Neg - animais não reagentes à TIC

4 - Pos - animais positivos ao teste de ADA

5- Neg - animais negativos ao teste de ADA

$$Kappa = -0,086$$

Tabela 4. Tabela de contingência de atividade sérica de ADA (ponto de corte 15 U/l) e tuberculização intradérmica comparada para obtenção do grau de concordância entre os dois métodos diagnósticos

ADA	Tuberculização ¹		Total
	Pos ²	Neg ³	
Pos ⁴	0	12	12
Neg ⁵	52	192	244
Total	52	204	256

1 - Tuberculização intradérmica comparada (TIC)

2- Pos - animais reagentes à TIC

3 - Neg - animais não reagentes à TIC

4 - Pos - animais positivos ao teste de ADA

5- Neg - animais negativos ao teste de ADA

$$Kappa = -0,082$$

A correlação entre os valores séricos de ADA e os da tuberculização intradérmica comparada foi baixa ($r=0,129$).

5 DISCUSSÃO

O aumento de atividade de ADA em fluidos biológicos tem sido usado para fins diagnósticos principalmente em pacientes com efusões pleurais, e, em menor escala, em pacientes com efusões pericárdicas e em pacientes com meningite e ascite tuberculosas com boa sensibilidade e especificidade (L'Herminez, 1993), principalmente em áreas onde a prevalência de efusões tuberculosas excedem outras causas de efusões (Burgess et al., 1995)

Rodrigues et al. (1997) atentaram para a determinação dos valores séricos de ADA em bovinos não reagentes à tuberculinização intradérmica como referência de valores normais para futuros estudos, encontrando valores médios de 15,1 U/l. A média de atividade de ADA encontrada nos animais não reagentes à prova de tuberculinização intradérmica comprada no presente estudo foi menor que a encontrada por Rodrigues et al. (1997). Estes menores valores encontrados no presente experimento, que são comparáveis aos encontrados por Yasuda et al. (1996), podem ser devidos a diferenças entre as populações estudadas.

No presente estudo, a comparação das médias dos valores séricos de ADA em bovinos foi, diferente do que se esperava, maior no grupo não reagente que no reagente à tuberculinização intradérmica comparada. A maior média de valores séricos de ADA entre os animais não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada se deveu à grande percentagem (16,34%) de animais da propriedade 5 que apresentavam valores séricos de ADA superiores a 11,22 U/l, maior valor apresentado pelos animais positivos à tuberculinização intradérmica comparada. Quando foi retirada da análise a propriedade 5, as médias dos valores de ADA entre os grupos reagente e não reagente à tuberculinização intradérmica comparada não apresentaram diferenças significativas.

Os valores séricos de ADA elevados entre os animais da propriedade 5 poderiam se dever à infecção destes animais por outro agente infeccioso diferente do *M. bovis* como o vírus da leucose bovina (VLB). Posteriormente à análise, foi verificado que em alguns animais da propriedade 5 já haviam sido observados sinais clínicos de leucose enzoótica bovina tendo a doença sido confirmada naqueles animais por histopatologia. A presença de animais com sinais clínicos de leucose enzoótica bovina na propriedade 5 justificaria a taxa de altos valores séricos de ADA nos bovinos desta propriedade. Conforme observado por Yasuda et al. (1996), animais com a forma clínica de leucose enzoótica bovina apresentam níveis séricos de ADA muito elevados.

O espectro clínico e imunológico apresentado pelos animais infectados pelo *M. bovis*; a possibilidade de falta de correlação entre atividade apresentada no soro e no local da infecção e de baixa sensibilidade do método para diagnóstico da tuberculose bovina; bem como diferenças na produção das isoenzimas de ADA durante a resposta imune nas diferentes espécies e em resposta a diferentes estímulos patológicos poderiam justificar a ausência de elevação significativa dos valores séricos de ADA entre os animais reagentes em relação aos não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada no presente estudo. Em humanos, a determinação da atividade de ADA no soro apresentou uma baixa sensibilidade em relação à determinação de ADA em fluido pleural no diagnóstico da tuberculose, não sendo encontrada correlação entre atividade de ADA nos dois compartimentos (Orphanidou et al., 1996).

Tanto em bovinos sob estímulo do VLB (Yasuda et al., 1996), como no homem sob estímulo do *M. tuberculosis* (Lakshmi et al., 1992), foi demonstrado que a atividade de ADA sérica é influenciada pelo estágio clínico, sendo maior em estágios avançados da infecção ou doença que em períodos iniciais de infecção. A dosagem de ADA no homem para fins diagnósticos da tuberculose é empregada geralmente quando já se tem uma suspeita clínica, e serve como um diferencial clínico mais rápido para se definir a terapêutica (Chalhoub et al., 1996). Em outras palavras, o diagnóstico baseado na detecção de ADA, parece estar mais relacionado com a detecção de doença ou estágios avançados de infecção que de infecção em estágios iniciais (Lakshmi et al., 1992).

Animais infectados, sem sintomatologia clínica de tuberculose, constituíram a maioria dos animais reagentes à tuberculinização intradérmica comparada estudados neste trabalho. Esse fato possivelmente explica a não elevação das concentrações séricas de ADA no grupo de animais reagentes à tuberculinização intradérmica comparada no presente estudo.

Rodrigues et al. (1997) encontraram valores séricos de ADA aumentados nos dez bovinos tuberculosos estudados. Entretanto, o estado clínico dos animais não é mencionado. É provável que os dez animais por eles estudados apresentassem sinais clínicos de tuberculose bovina. Isto explicaria o aumento de atividade sérica de ADA naqueles animais e as diferenças encontradas em relação aos níveis séricos de ADA dos animais reagentes à tuberculinização intradérmica comparada do presente trabalho.

Mesmo que a determinação da atividade sérica de ADA possa diferenciar animais tuberculosos do restante da população, ainda assim sua utilidade seria limitada, uma vez que só a eliminação de animais doentes não eliminaria a infecção do rebanho, pois animais infectados pelo *M. bovis* e sem sinais clínicos de tuberculose permaneceriam no rebanho.

Apesar de no presente trabalho não terem sido quantificadas as isoenzimas de ADA, a ausência de ADA2 no soro de bovinos (Tanabe, 1993) pode explicar a ausência de aumento da atividade sérica de ADA nos animais reagentes à tuberculinização intradérmica comparada neste experimento, pois, no homem, a isoenzima de ADA predominante no soro de pacientes tuberculosos foi a ADA2 (Ungerer et al., 1992; Ungerer et al., 1994).

Ungerer et al. (1992) e Ungerer et al. (1994) concluíram que a atividade de ADA, especialmente ADA2, no homem pode ser um conveniente marcador da imunidade mediada por células. A tuberculinização é uma medida *in vivo* de imunidade celular contra antígenos micobacterianos. A análise de regressão dos valores séricos de ADA em função dos valores de aumento de espessura da dobra de pele, medidos pela tuberculinização intradérmica comparada, revelou uma ausência de associação entre estas duas variáveis sugerindo que a atividade de ADA não reflete a resposta imune celular específica contra *M. bovis*.

A dispersão dos valores de ADA entre os animais reagentes e os não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada deixa clara a dificuldade de estabelecimento de um ponto de corte visando distinguir esses dois grupos de animais pela detecção sérica de ADA (Fig. 1). O tipo de distribuição da população animal, reagentes e não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada, com base nos valores séricos de ADA no presente estudo foi do tipo unimodal, ou seja, uma população confundiu-se com a outra (Fig. 2). Em distribuições onde não há excessiva confusão entre indivíduos infectados e não infectados, a escolha de um determinado ponto de corte depende do objetivo epidemiológico que se quer alcançar com o método diagnóstico, maior sensibilidade ou maior especificidade, sendo que a escolha de uma alta sensibilidade geralmente conduz a uma baixa especificidade e vice-versa (Smith, 1995).

A análise de concordância, realizada pelo teste de kappa, entre a tuberculinização intradérmica comparada e os valores séricos de ADA, utilizando-se pontos de corte iguais a 6,12 U/l e 15 U/l, demonstraram uma discordância quase total entre os dois métodos utilizados. Isto impossibilitou a determinação de um ponto de corte com algum objetivo diagnóstico ou epidemiológico, visto que os valores séricos de ADA das populações reagentes e não reagentes à tuberculinização comparada se confundem excessivamente (Figs. 1 e 2).

A utilização da determinação da atividade sérica de ADA como teste diagnóstico da tuberculose bovina torna-se mais difícil quando se percebe que, à semelhança do que ocorre no homem (Chalhoub et al., 1996), outras patologias, como a forma clínica da leucose enzoótica bovina (Yasuda et al., 1996), doença que está presente em nosso país (Braga et al., 1997), também podem acarretar um aumento de sua atividade.

Embora no presente trabalho a determinação de ADA em soro de bovinos não tenha se apresentado como um bom teste para o diagnóstico da tuberculose bovina, maiores estudos sobre esta enzima são requeridos em bovinos: tanto aqueles que tratam de aspectos básicos (células produtoras, mecanismos de produção, isoenzimas produzidas) bem como aqueles que tratam de sua determinação em soro e outros fluidos biológicos para fins diagnósticos.

6 CONCLUSÕES

A atividade de adenosina deaminase não estava aumentada em soros de bovinos reagentes em comparação ao soro de bovinos não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada;

A pesquisa de atividade de ADA no soro de bovinos não se constituiu em um método capaz de diferenciar animais reagentes de animais não reagentes à tuberculinização intradérmica comparada, não se revelando, pois, como um bom método auxiliar no diagnóstico da tuberculose bovina.

SUMMARY

The determination of serum levels of adenosine deaminase (ADA), enzyme produced by monocytes/macrophages and lymphocytes, has been used in the diagnosis of human tuberculosis. In the present study, serum activity of ADA was tested as a complementary test in the diagnosis of bovine tuberculosis. Two hundred fifty-six animals were classified by the comparative skin test using bovine and avian PPD's in reactors (52 animals), from herds where the *Mycobacterium bovis* had previously been isolated, and non-reactors (204), from tuberculosis-free herds. Mean ADA serum values from reactor animals (4.45 ± 2.33 U/l) were significantly smaller ($p=0.008$) than those observed in sera from non-reactor animals (6.12 ± 4.47 U/l). When non-reactor animals from a herd with clinical cases of bovine enzootic leukosis were withdrawn from analysis, the mean ADA serum values of the non-reactor group (5.12 ± 3.75 U/l) was not different from that of the reactor group ($p=0.28$). Using two different cutoff points, 6.12 U/l and 15 U/l, there was no agreement between the determination of ADA serum values and the comparative skin test in the detection of tuberculous animals ($\kappa = -0.086$ and $\kappa = -0.082$, respectively). In conclusion, the determination of ADA serum activity was not a good complementary test for bovine tuberculosis, because it was not possible to distinguish skin test reactors and non-reactors by ADA serum levels.

Key-works: bovine tuberculosis, diagnosis, adenosine deaminase

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA-Kit (Biokits). *Inf.Téc.Lab.Biokits*.
- AMMANN, A.J. & FUDENBERG, H.H. Enfermedades por inmunodeficiencia. In: Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. et al. ed. *Inmunologia Clínica*. 2nd ed. Mexico: Editorial El Moderno S.A, 1980.
- BAGANHA, M.F., PEGO, A., LIMA, M.A. et al. Serum and pleural adenosine deaminase; correlation with lymphocytic populations. *Chest*. v.97, p.605-610, 1990.
- BARTON, R.W. & GOLDSHNEIDER, I. Nucleotide metabolizing enzymes and lymphocytic differentiation. *Mol. Cell Biochem*. v.28, p.135-147, 1979.
- BOTHAMLEY, G.H. Tuberculous pleurisy and adenosine deaminase. *Thorax*. v.40, p.593-594, 1995.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. *Bol. Def. San. Ani*. v.22, 1988.
- BRAGA, F.M., VAN DER LANN, C.N., HALFEN, D.C. et al. Avaliação de métodos de controle da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina. *Rev. Ciênc. Rural*. v.27, p.635-640, 1997.
- BURGESS, L. J., MARITZ, F.J., ROX, I.L. et al. Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/neutrophil ratio increased specificity for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest*. v.109, p.414-419, 1996.
- BURGESS, L.J., MARITZ, F.J., LE ROUX, I. et al. Use of adenosine deaminase as a diagnostic tool for tuberculous pleurisy. *Thorax*. v.50, p.672-674, 1995.
- CARSON, A. & SEEGMILLER, J.E. Effect of adenosine deaminase inhibition upon human lymphocyte blastogenesis. *J.Clin. Invest*. v.57, p.274-282, 1976.

- CHALHOUB, M., CRUZ, A.A., MARCÍLIO, C. et al. Valor da determinação da atividade de adenosina desaminase (ADA) no diagnóstico diferencial dos derrames pleurais. *Rev. Ass. Med. Brasil.* v.42, p.139-146, 1996.
- CLARK, W.R. *At War Within The Double-Edged Sword of Immunity.* New York Oxford: Oxford University Press, 1995.
- COLLINS, J.D. Developments in the diagnosis of tuberculosis. *Ir. Vet. J.* v.48, p.149-152, 1995
- CORRÊA, C.N. & CORRÊA, W.M. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol São Paulo.* v. 43, p131-134, 1974
- COSIVI, O., GRANGE, J.M., DABORN, C.J. et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* v. 4, p.59-70, 1998.
- COUSINS, D.V., WILTON, S.D., FRANCIS, B.R. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* v.27, p.187-195, 1991.
- DABORN, C.J. & GRANGE, J.M. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br. Vet. J.* v. 149, p.405-418, 1993.
- DEAN, A.G., DEAN, J.A., COULOBIER, D., BRENDEL, K.A., SMITH, D.C., BURTON, A.H., DICKEN, R.C., SULLIVAN, K., FAGAN, R.F., AMER, T.G. Epi Info, version 6: a word-processing, database, and statistics for public health on IBM-compatible microcomputers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 1995.
- ELLIS, G. & GOLDBERG, D.M. A reduced nicotinamide adenine dinucleotide-linked kinetic assay for adenosine deaminase activity. *J. Lab. Clin. Med.* v.76: 507-517, 1970.
- FRANKENA, K., NOORDHUIZEN, J.P., WILLEBERG, P. et al. O EPISCOPE: computer programs in veterinary epidemiology. *Vet. Rec.* v. 126, p.573-576, 1990.
- GIUSTI, G. & GALANTI, B. Colorimetric method. In: BERGMEYER HU, ed. *Methods of enzymatic analysis.* 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1984. p. 315-323.

- GONÇALVES, V.S.P. Programas de controle e erradicação da tuberculose bovina. In: In: LAGE, A.P., LOBATO, F.C., MOTA, P.M.P. et al. Atualização em Tuberculose Bovina. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Coordenação Preventiva. p.53-60, 1998.
- GONÇALVES, V.S.P. Propriedades e utilização de testes de diagnóstico em função do contexto epidemiológico: aplicação no controle da tuberculose bovina. In: In: LAGE, A.P., LOBATO, F.C., MOTA, P.M.P. et al. Atualização em Tuberculose Bovina. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Coordenação Preventiva. p.61-65, 1998.
- HALL, J.G. Adenosine deaminase activity in lymphoid cells during antibody production. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* v.41, p.93-97, 1963.
- HARBOE, M., WIKER, H.G., DUNCAN, J.R. et al. Protein G-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Anti-MPB70 antibodies in Bovine Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* v.28, p.913-921, 1990.
- KANTOR, I.N., LOPEZ, B., TORRES, P. et al. Preliminary evaluation of a simple method for the detection of bovine tuberculosis: the glutaraldehyde test. *J. Vet. Med.* v.40, p.27-30, 1993.
- KOEHLER, L.H. & BENZ, E.J. Serum adenosine deaminase: Methodology and clinical applications. *Clin. Chem.* v.8, p.133-140, 1962.
- L'HERMINEZ, R.H. Urgent need for a new approach tool the diagnosis of tuberculosis in developing countries in the decade of AIDS. *Trop. Geograp. Med.* v.45, p.145-149, 1993.
- LAKSHMI, V., RAO, R.R., JOSHI, N. et al. Serum adenosine deaminase activity in bacillary or paucibacillary pulmonary tuberculosis. *Indian J. Pathol. Microbiol.* v.35, p.48-52, 1992.
- LANGENEGGER, J., LANGENEGGER, C.H., MOTA, P.M.C. et al. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. *Pesq. Vet. Bras.* v.4, p.145-149, 1981.
- MONAGHAN, M. L., DOHERTY, M.L., COLLINS, J.D. et al. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* v.40, p.111-124, 1994.
- MOTA, P.M.P. Tuberculose Bovina. In: SEAA/DEFIS/DDSA. Tuberculose Bovina, Brucelose e Portaria Ministerial. p.23-76, 1996.

- MOTA, P.M.P. & LOBATO, F.C. Tuberculose bovina: uma revisão. In: LAGE, A.P., LOBATO, F.C., MOTA, P.M.P. et al. Atualização em Tuberculose Bovina. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Coordenação Preventiva. p.3-34, 1998.
- NISHIHARA, H., AKEDO, H., HATTORI, S. Multienzyme patterns of serum adenosine deaminase by agar gel electrophoresis: a evaluation of the diagnostic value in lung cancer. *Clin. Chim Acta.* v.30, p.251-258, 1970.
- O'REILLY, L.M. Tuberculin skin tests: sensitivity and specificity. In: Thoen, C.O., Steele, J.H. ed. *Mycobacterium bovis. Infections and Animals and Humans.* Ames: Iowa State University, 1995. p.85-92.
- OCAÑA, I., RIBERA, E., BEJARANO, E. et al. Subpoblaciones linfocitarias en los derrames pleurales: relación con la actividad de ADA. *Ann. Med. Intern. (Madrid).* v.6, p.274-278, 1988.
- OIE. Manual of Standards For Diagnostic Tests and Vaccines. 3rd ed. Geneva, 1996.
- OPS. Primer Seminario Internacional Sobre Tuberculosis Bovina Para las Americas. Santiago, 1970.
- ORPHANIDOU, D., GAGA, M., RASIDAKIS, A. et al. Tumour necrosis factor, interleukin-1 and adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion. *Respir. Med.* v.90, p.95-98, 1996.
- PIRAS, M.A. & GAKIS, C. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity in tuberculosis meningitis. *Enzyme.* v.14, p.311-317, 1973.
- PIRAS, M.A., GAKIS, C., BUDRONI, M. et al. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. *Br. Med. J.* v.2, p.1751-1752, 1978.
- PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J. Comp. Pathol.* v.99, p.357-399, 1988.
- RODRIGUES, L. E. A., MATIAS, C.M.C., ARAUJO, F.L.V. et al. A kit for practical, simple and rapid assay of adenosine deaminase activity in biological fluids. *Arqu. Biol. Tecnol.* v.36, p.115-124, 1993.
- RODRIGUES, L.E.A., LYRA, E. DE P., MELO, M.C.A. Atividade da adenosina deaminase nos diversos líquidos biológicos como método auxiliar de diagnóstico prático, rápido e barato da tuberculose bovina. *A Hora Veterinária.* n.97, p.58-61, 1997.

- SMITH, R.D. *Veterinary Clinical Epidemiology A Problem-Oriented Approach*. 2nd ed. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press, 1995.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 7th ed. Ames: Iowa Stat. University, 1980. 507p.
- SUFFYS, P.N., ARAUJO, M.E.I., DEGRAVE, W.M. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.92, p.297-316, 1997.
- TANABE, T. Adenosine deaminase activities in the sera and tissues of animals and their clinical significance. *Jpn. J. Vet. Res.* v.41, p.52, 1993.
- THOEN, C.O. & BLOOM, B.R. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: THOEN, C.O., STEELE, J.H. eds. *Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans*. Iowa State University, Ames, 1995, p.3-14.
- UNGERER, J.P.J., OOSTHUIZEN, H.M., BISSBORT, S.H. et al. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin.Chem.*v.38, p.1322-1326, 1992.
- UNGERER, J.P.J., OOSTHUIZEN, H.M., RETIEF, J.H. et al. Significance of adenosine deaminase activity and its isoenzymes in tuberculous effusions. *Chest*. v.106, p.33-37, 1994.
- VALDÉS, L., ALVAREZ, D., SAN JOSÉ, E. et al. Value of adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusions in young patients in a region of high prevalence of tuberculosis. *Thorax*. v.50, p.600-603, 1995.
- VALDÉS, L., SAN JOSÉ, E., ALVAREZ, D. et al. Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lylozyme and interferon gamma. *Chest*. v.103, p.458-465, 1993.
- VALDÉS, L., SAN JOSÉ, E., AVAREZ, D. et al. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *Eur. Respir. J.* v.9, p.747-751, 1996a.
- VALDÉS, L., ALVAREZ, D., SAN JOSÉ, E. et al. Value of adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusions in young patients in a region of high prevalence of tuberculosis. *Ver. Ass. Med. Brasil*. v.42, p.139-146, 1996b.

- VAN KEIMPEMA, A.R.J., SLAATS, E.H., WAGENAAR, J.M.P.
Adenosine deaminase, not dignostic for tuberculous pleurisy. *Eur. J. Respir. Dis.* v.71, p.15-18,1987.
- WOOD, P.R. & ROTHEL, J.S. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* v.40, p.125-135, 1994.
- YASUDA, J., TANABE, T., HASHIMOTO, A. et al. Adenosine deaminase (ADA) ativity in tissues and sera from normal and leukaemic cattle. *Br. Vet. J.* v.152, p.485-489, 1996.