

diagnóstico da tuberculose animal

indireto

direto

- teste da tuberculina
- gama-interferon
- elisa

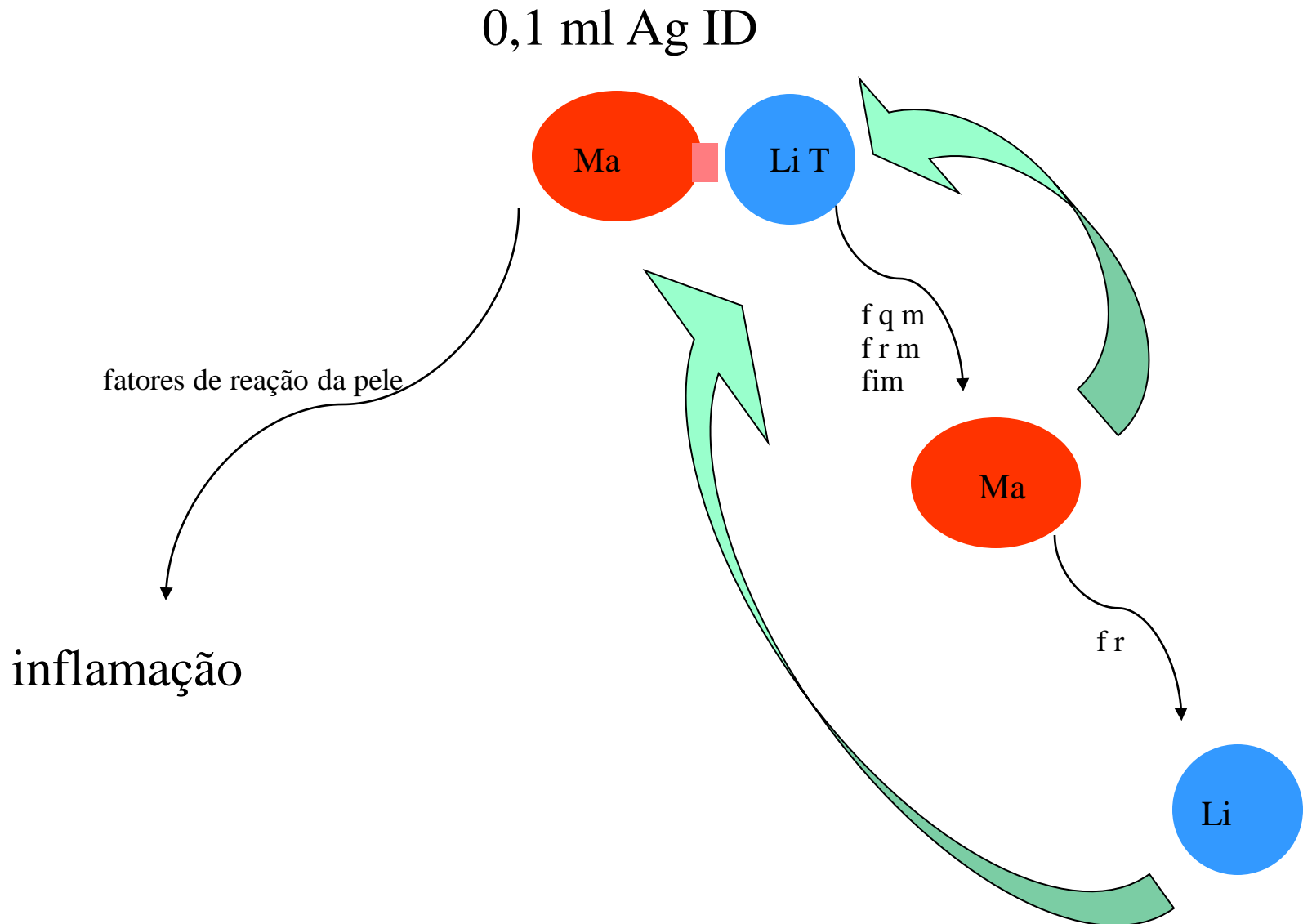
Tuberculina - história

- **Villemin (1865) - Natureza infecciosa da doença;**
- **Robert Koch (1882) - Isolamento do agente de lesão em humanos;**
(1890) - Tuberculina O.T.
- **Dorset (1934) - Meio sintético;**
- **Seibert (1934) - PPD;**
- **Inglaterra (1940) – Teste Cervical Comparativo;**
- **Início da produção de PPD no Brasil (1970);**
- **PNCEBT 2001**

Tuberculina

- **Composição:**
 - tubérculo-proteína oriunda do cultivo de *M. bovis* AN₅ ou *M. avium* D₄;
- **Concentração:**
 - PPD bovina: 1,0 mg/mL;
 - PPD aviária: 0,5 mg/mL;
- **Apresentação:**
 - PPD bovina: líquido incolor;
 - PPD aviária: líquido avermelhado;
- **Conservação:**
 - manter sob temperatura de 2 a 8°C.
 - Não congelar;
 - Validade: 1 ano;

mecanismo de ação



teste da tuberculina

Diagnóstico alérgico:

- vantagens:

- Alta eficiência dos testes padronizados;
- Capacidade de detectar infecções recentes;
- Simplicidade de execução dos testes;

- desvantagens:

- Possibilidade de reações inespecíficas;
- Ocorrência de animais anérgicos;
- Exigência de intervalo mínimo entre testes;
- Exigência de duas visitas à propriedade.

resultados falsos

- falso negativos

- infecção recente
- parto e puerpério
- anergia

- falso positivos

- MAC
- MOTT
- *Nocardia sp*

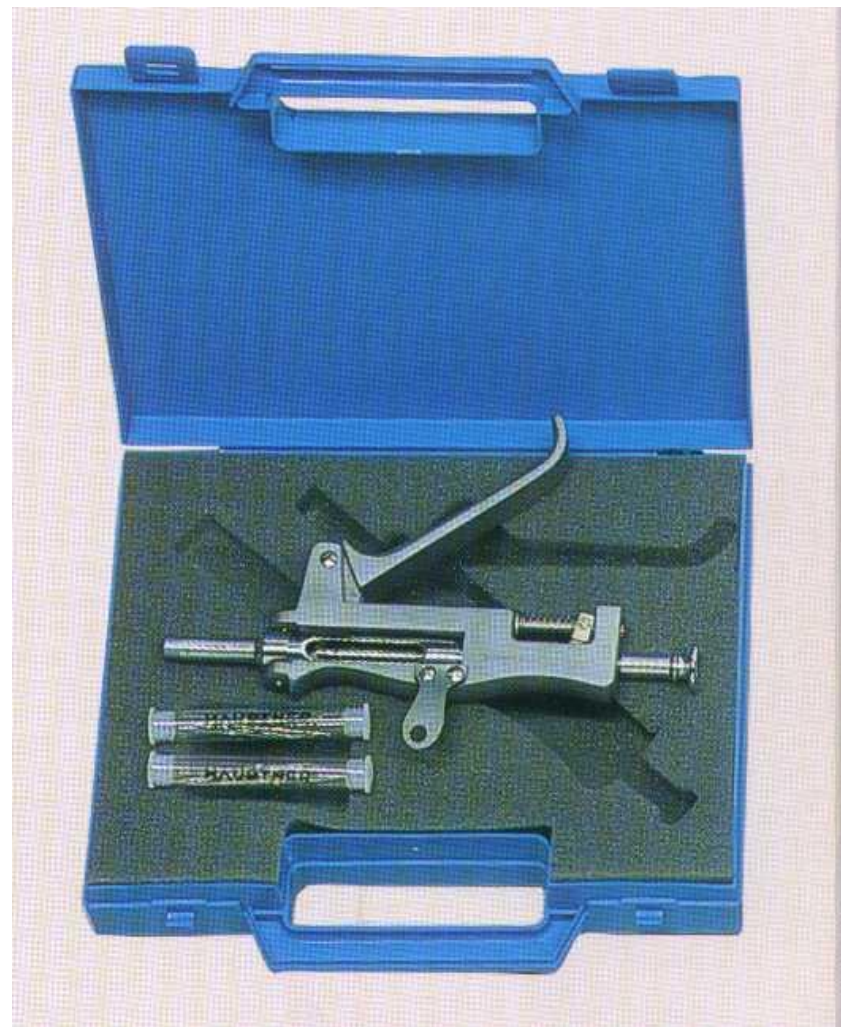


Equipamento

- Seringas multidose automáticas próprias para tuberculização de 0,1 mL
- Agulhas próprias
(Limpas, secas e sem resíduos de desinfetantes)
- Cutímetro com mola para uso veterinário
- Aparelho para tricotomia



Equipamento



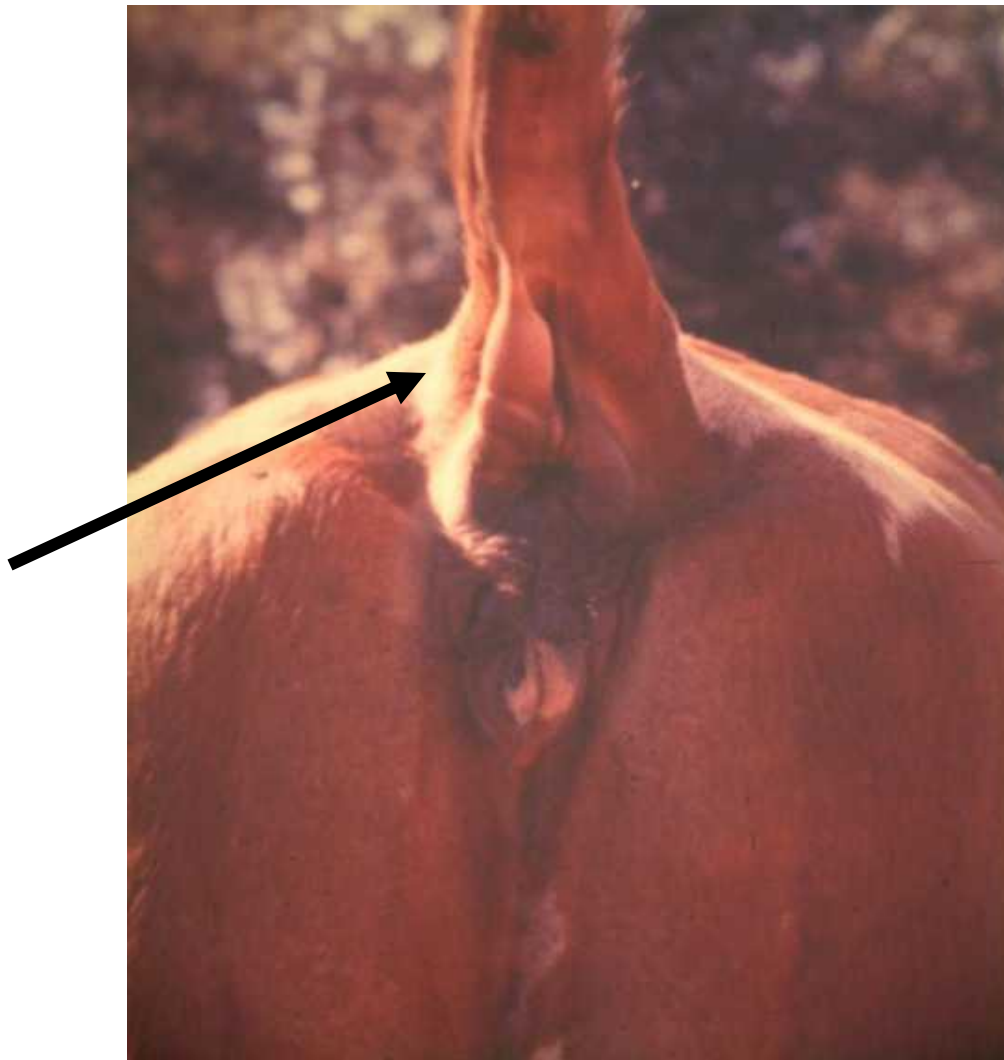
PNCEBT - Brasil

- teste da prega caudal (TPC)
- teste simples cervical (TSC)
- teste cervical comparativo (TCC)

Teste da Prega Caudal – (TPC)

- **Teste de triagem permitido apenas em estabelecimento de pecuária de corte;**
- **Local de inoculação:**
 - **na prega da cauda, 6 a 10 cm base da cauda na junção das peles pilosa e glabra;**
- **Dosagem : 0,1 mL de PPD Bovino, via I.D.;**
- **Leitura: 72 horas \pm 6 horas;**
- **Interpretação: avaliação visual e palpação;**
 - **Animal reagente: qualquer aumento na prega inoculada.**
 - **Não reagente: ausência de qualquer reação no local da aplicação.**

Teste da Prega Caudal – (TPC)



Reação tuberculínica positiva em bovino.

Teste Cervical Simples – (TCS)

- para estabelecimento de pecuária de leite ou corte;
- Local de inoculação:
 - No terço médio da tábua do pescoço;
 - Na região da espinha da escápula;
- Dosagem : 0,1 mL de PPD Bovino, via I.D.;
- Leitura: antes da aplicação e 72 horas \pm 6 horas após;
- Interpretação:
 - 0 a 1,9 mm = negativo
 - 2,0 a 3,9 mm = inconclusivo
 - maior de 4,0 mm = positivo

Teste Cervical Comparativo – (TCC)

- **Teste confirmatório permitido em estabelecimento de pecuária de leite ou corte;**
- **Teste diagnóstico para rebanhos com ocorrência de reações inespecíficas;**
- **Local de inoculação:**
 - **No terço médio da tábua do pescoço;**
 - **Na região da espinha da escápula;**
- **Dosagem :**
 - **0,1 mL de PPD Bovino e 0,1 mL de PPD Aviário , via I.D.;**

Teste Cervical Comparativo – (TCC)

- **Leitura: antes da aplicação e 72 horas \pm 6 horas após;**
- **Interpretação:**
- **Diferença entre as reações ao PPD Bovino e o Aviário:**

$\Delta B - \Delta A$	interpretação
$\leq 1,9$ mm	negativo
2 mm a 3,9 mm	inconclusivo
$\geq 4,0$ mm	positivo









Certificação de Propriedades Livres

- teste em todos os animais com idade igual ou superior a 6 semanas
- animais positivos são sacrificados
- o rebanho recebe o certificado após 3 testes negativos em todos os animais
- *último teste acompanhado pelo serviço oficial*
- compra de animais de outro rebanho certificado ou mediante apresentação de exame negativo
- renovação anual do certificado - novo teste em todo o rebanho

lógica

Propriedade infectada

teste 1 teste 2 teste 3 teste 4 teste 5

Propriedade livre

saneamento

Propriedade não infectada

teste 1 teste 2 teste 3

Propriedade livre

Propriedades Monitoradas (gado de corte)

- Normas

- Primeiro teste por amostragem no plantel de animais c/ + de 24 meses; primeiro teste com 99% de probabilidade de detecção de um animal +;
- Testes subseqüentes por amostragem c/ 95% de probabilidade de detecção. Retestes a cada dois anos;
- Quando é encontrado um positivo, através do teste, ou na inspeção, todos os animais c/ + de 24 meses são testados, sacrificando os positivos
- compra de fêmeas e machos reprodutores só de outro rebanho de condição sanitária igual ou superior, ou mediante apresentação de exame negativo
- Relatório de inspeção de todos os animais abatidos (no caso de detecção de lesão suspeita de tuberculose, material é enviado a laboratório de referência ou oficial credenciado)

Tabela de Amostragem para o teste inicial:

Número de fêmeas a partir de 24 meses de idade e de machos reprodutores

Existentes no Rebanho	A serem testados
≤ 350	255
351-500	300
501-750	350
751-1500	400
1501-5000	440
> 5000	460

(*) Parâmetros de amostragem: (1) probabilidade de detecção de um ou mais animais reagentes (grau de confiança) = 99%; (2) porcentagem mínima esperada de animais reagentes no rebanho = 1%

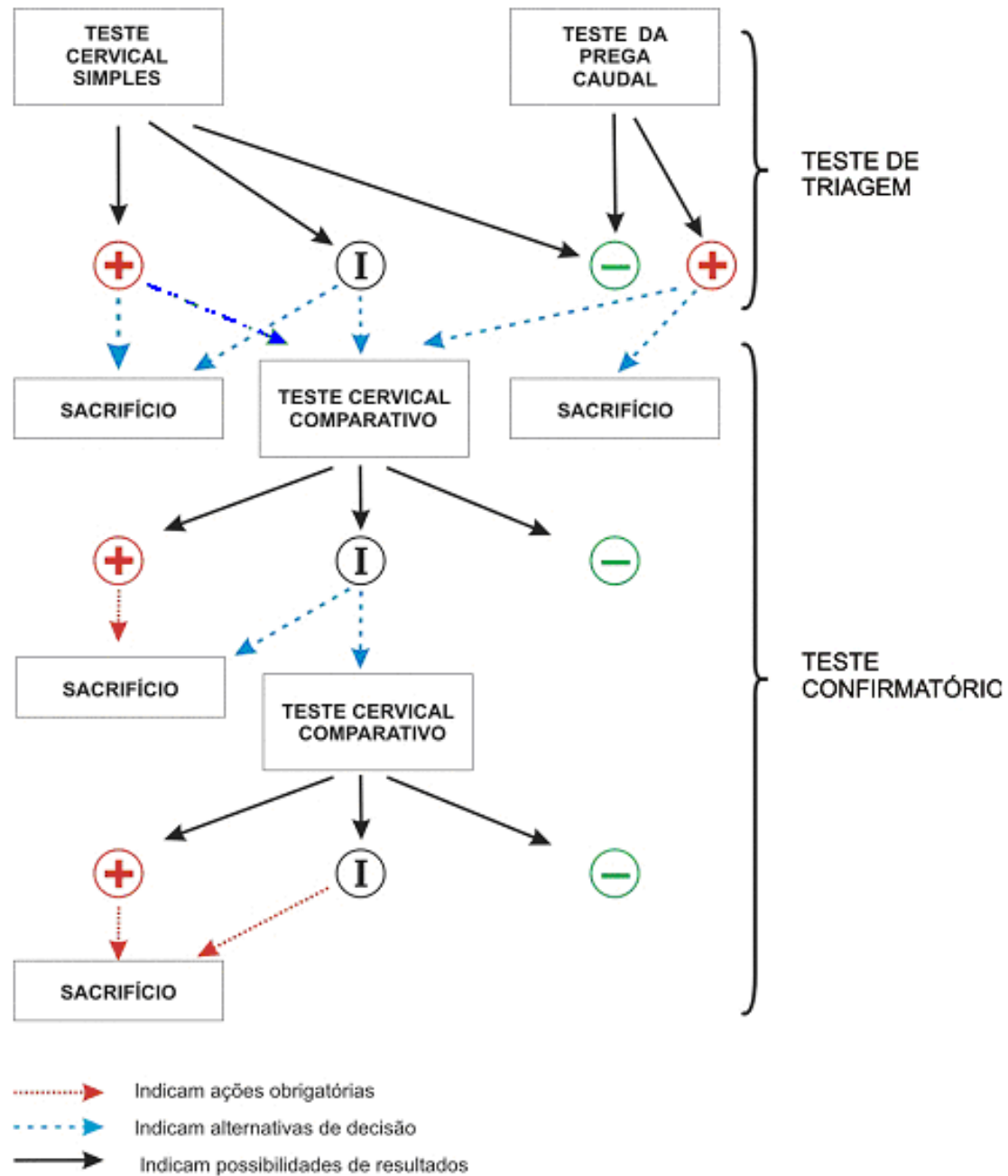
Tabela de Amostragem para o reteste periódico:

Número de fêmeas a partir de 24 meses de idade e de machos reprodutores

Existentes no Rebanho	A serem testados
≤350	200
351-500	225
501-750	250
751-1500	270
1501-5000	290
>5000	300

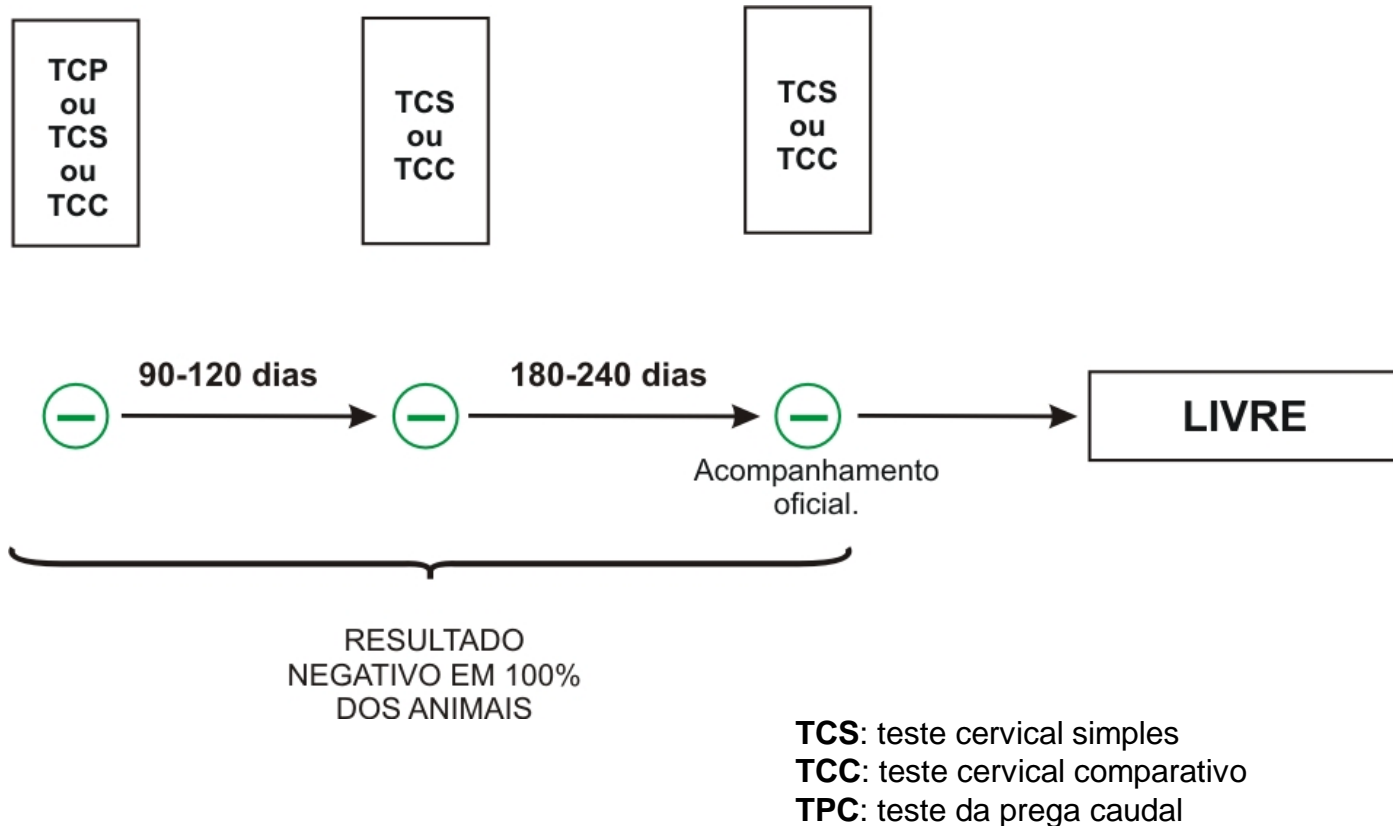
(*) Parâmetros de amostragem: (1) probabilidade de detecção de um ou mais animais reagentes (grau de confiança) = 95%; (2) porcentagem mínima esperada de animais reagentes no rebanho = 1%

DIAGNÓSTICO TUBERCULOSE



ETAPAS DE SANEAMENTO - TUBERCULOSE:

Enquanto forem obtidos resultados de animais reagentes positivos, deve-se continuar realizando testes e sacrifício ou destruição desses animais. O intervalo entre esses testes deve ser de 90 a 120 dias, até que se obtenha um resultado negativo de TODOS os animais examinados.



segundo teste

animal	ppd bovino		ppd aviário		Δ ppd bovino	Δ ppd aviário	Δ ppd bov- Δ ppd avi	resultado	observações
	0	7 2	0	7 2	7 2 - 0	7 2 - 0			
1	8	10	8	11	2	3	-1	n	
3	7	15	7	8	8	1	7	p	
5	8	10	9	10	2	1	1	n	
6	8	10	9	12	2	3	-1	n	
10	8	9	8	8	1	0	1	n	
11	8	9,2	8	9	1,2	1	0,2	n	
12	8	8	8	9	0	1	-1	n	
13	7	8,5	7	8	1,5	1	0,5	n	
14	10	11	11	12	1	1	0	n	
15	8	9	8,3	15	1	6,7	-5,7	n	
16	9	9	9	10	0	1	-1	n	
17	8	10	8	9	2	1	1	n	
18	7	10	7	14,3	3	7,3	-4,3	n	
19	7	8	7	7	1	0	1	n	
21	10,6	12	9,2	10	1,4	0,8	0,6	n	
22	8	9,2	8,1	9	1,2	0,9	0,3	n	



SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL



Programa Nacional de
Controle e Erradicação
da Brucelose e da
Tuberculose Animal - PNCEBT





IMUNIDADE CELULAR

ELISPOT (*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*)

PRIMAGAM[®] (IFN- γ)

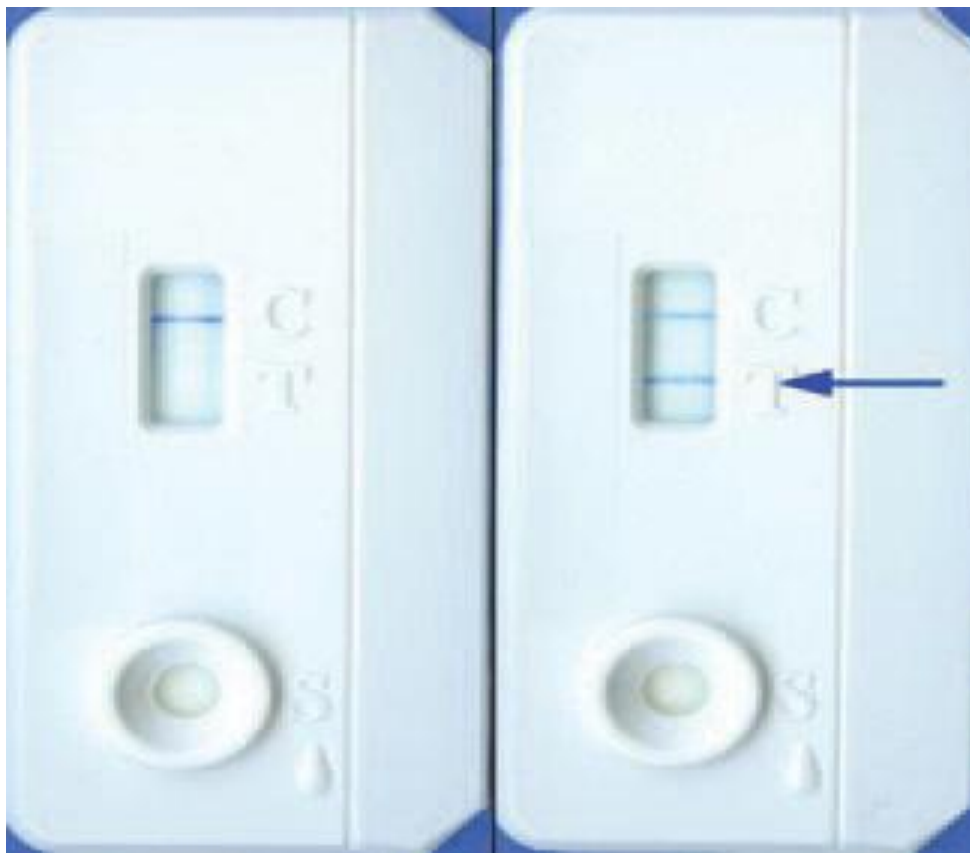
IMUNIDADE HUMORAL

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Western Blot (*Immunoblot*)

MAPIA (*Multiantigen Print Immunoassay*)

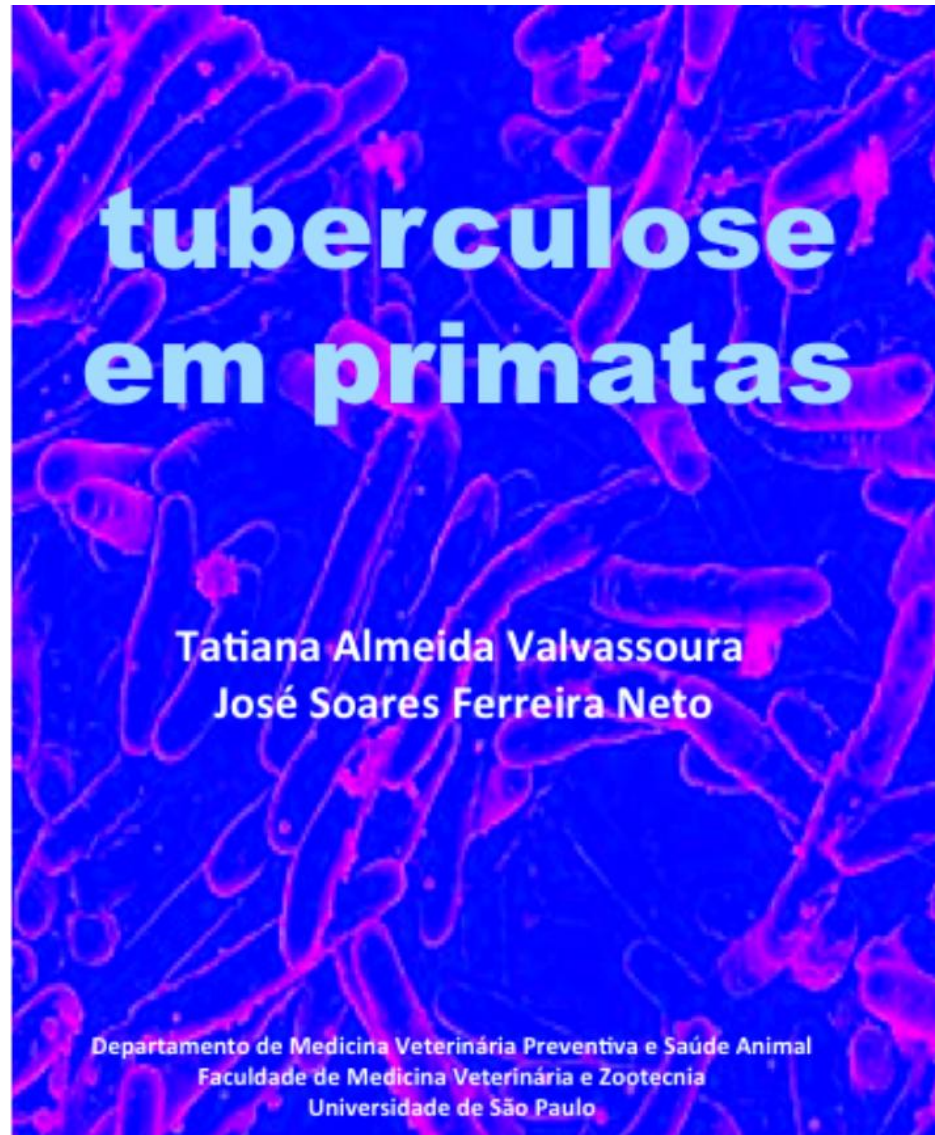
Prima-TB STAT-PAK[®]



Teste Prima-TB STAT-PAK[®]. A figura da esquerda representa resultado negativo e a da direita positivo; na janela do teste, a linha mais acima, presente em ambos os lados, é a banda controle; a linha mais abaixo (seta) é a banda que indica resultado positivo

Fonte: LYASHCHENKO et al., 2007

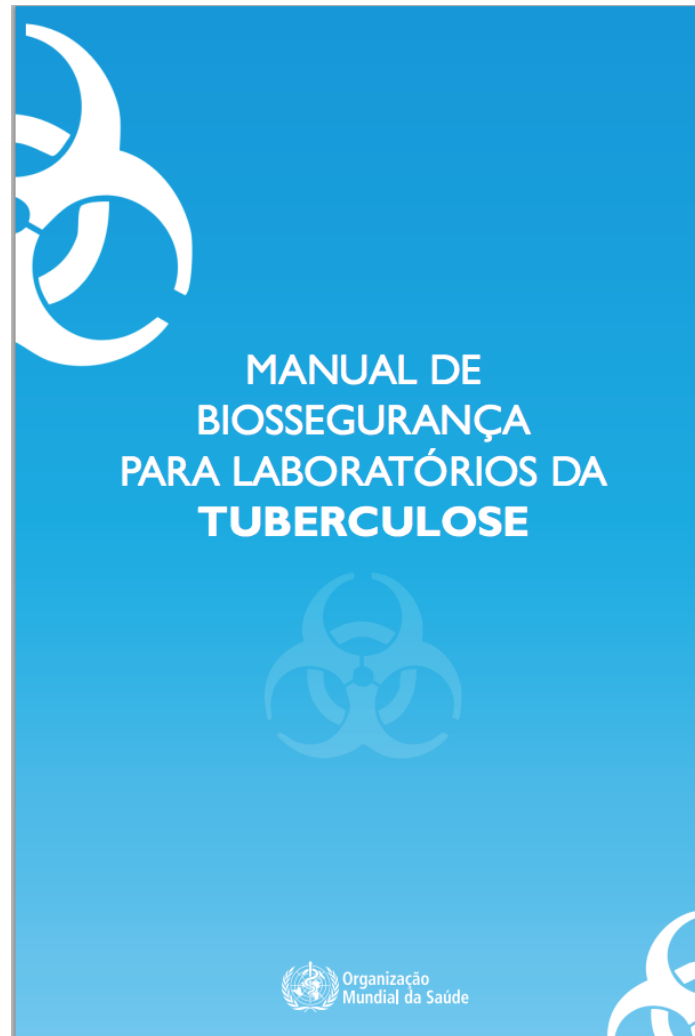
Sugestão de leitura



diagnóstico direto da tuberculose bovina

Mycobacterium bovis

Nível de Biossegurança 3 (NB-3)



Qual a utilidade?

diagnóstico individual

x

sistema de vigilância / apoio ao programa
(estudos epidemiológicos)

possibilidades

- baciloscopia
- isolamento e identificação
- inoculação em animais lab
- métodos moleculares









7 16:14







Tuberculose Pulmonar.



Linfonodo bovino com lesão caseosa.



Fígado Bovino.

Notar nódulo de caspecto caseoso.



Tuberculose genital.





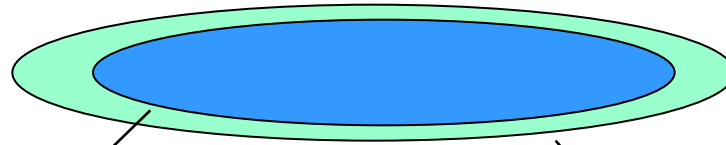
transporte

- refrigeração
- congelamento
- sol. sat. borato de sódio (140 g/l)



base teórica

60 % de lipídeos na parede celular



álcool-ácido resistência

resistência a álcalis e ácidos

Petroff

- 1- homogeinização
- 2- Na OH 4% / 20 minutos
vermelho de fenol
- 3- HCl 1N
- 4- filtração
- 5- centrifugação
- 6- ressuspensão do sedimento
- 7- inoculação em Lowenstein Jensen e Stonebrink Lesslie por 60 dias

Hexadecylpyridinium chloride

HPC 1,5%

- 60 amostras: NaOH 4%, HPC 1,5%, H₂SO₄ 12% e controle
- comparação de duas proporções, pelo teste de qui²

proporção de contaminação

HPC = 3%

controle=88% (p<0,001), NaOH= 33% (p<0,001), H₂SO₄=21,7% (p=0,002)

proporção de sucesso no isolamento

HPC = 40%

controle=3% (p<0,001), NaOH=13% (p=0,001), H₂SO₄=1,7% (p<0,001).

mp 126/03
1-1690

GUIA ACOMPANHATÓRIA
lesão suspeita de tuberculose colhida em matadouro

SIF 2259
6

número do frasco

1-DADOS DO MATADOURO REGISTRADO NO SIF 2259

Nº de registro: 2259 POINS: São Carlos/SP.
Nome do estabelecimento: FRIG. ANGELINI LTDA.
Telefone: xx-19-34159500 e-mail: angelini@p.com.br.
Méd. Vet. Encarregado IF: DR. MANOEL ADEO MARTINS DORNELLAS
Telefone: xx-19-34-159500 - RUA 241

2-PROCEDÊNCIA DO ANIMAL

Informações do GTA: Número do GTA: 1902510
Local de emissão do GTA: CASA DA AGRICULTURA DE CAPIVARI-SP.
Nome do proprietário: JUVENIL FORTI E OUTROS.
Nome do estabelecimento: SÍTIO BOA VISTA.
Município: CAPIVARI Estado: SP.
Informações a serem obtidas do proprietário do animal:
É de criação própria? Sim (X) Não () Qual a procedência?
Proprietário: JUVENIL FORTI E OUTROS
Propriedade: SÍTIO BOA VISTA Município: CAPIVARI/SP.

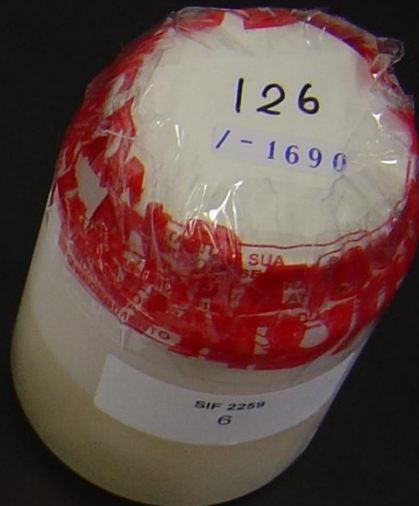
3-DADOS DA AMOSTRA

Data da Colheita: 26/08/2003
Espécie: (X) Bovina () Bubalina Sexo: () M (X) F
Raça (vide verso): (X) Zebu () Europeu leite () Europeu corte () SRD () Outras raças
Idade: () até 12 meses () 12 a 24 meses () 24 a 32 meses (X) mais que 36 meses

Distribuição das lesões na carcaça:	Linfonodos		
(X) Trato Respiratório	Apical ()	Isquiáticos ()	Pré-peitorais ()
() Trato Digestivo	Atloídiano ()	Mediastinais ()	Retro faringianos ()
() Linf. da cabeça e pescoço	Costo cervical ()	Mesentéricos ()	Retro mamários ()
() Úbere	Esofágiano ()	Parotidianos ()	Subscapulares ()
() Outro, qual:	Hepáticos ()	Poplitos ()	Sublinguais ()
Material Colhido:	Iliacos ()	Pré-curais ()	Supra esternal ()
() Tonsila	Inguinais ()	Pré-escapulares ()	Traqueos-bronquicos (X)
() Pulmão	Obs:		
(X) Linfonodo			
() Outro, qual:			

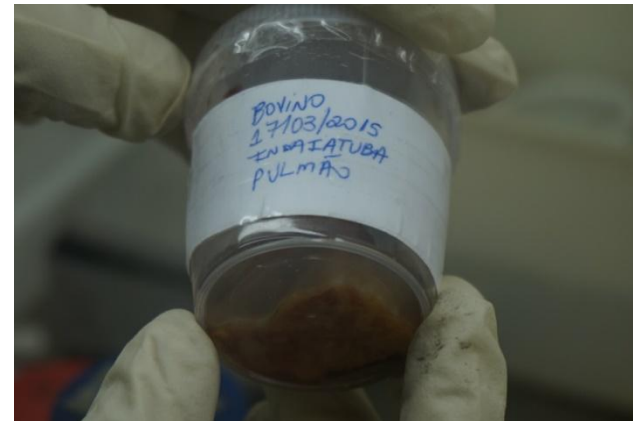
Carimbo e assinatura do Méd. Vet. Encarregado IF

DR. MANOEL ADEO M. DORNELLAS
FISCAL FEDERAL AGROPECUÁRIO
MÉDICO VETERINÁRIO
CRMV-SP 1304



Recebimento das amostras

- Acondicionado em recipiente hermético
- Guia acompanhatória com dados do animal
- Condições de transporte:
 - <48h: refrigeração (4-8° C)
 - >48h: congelamento (-20° C)
 - Até 30 dias: solução saturada de borato de sódio



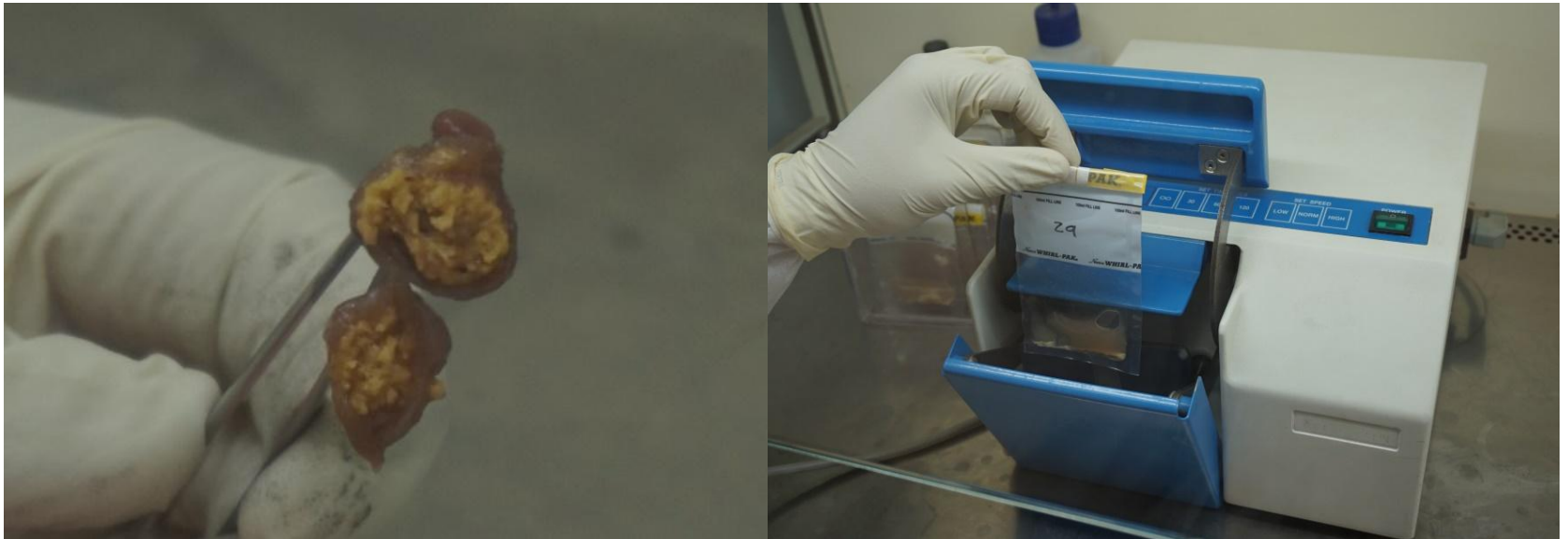
Cultivo: manipulação

- Cabine de segurança biológica classe NBII ou III
- Equipamentos de proteção individual (EPI)



Cultivo: homogeneização

- Solução salina 0,85% estéril
- Homogeneizador Stomacher



Cultivo: descontaminação*

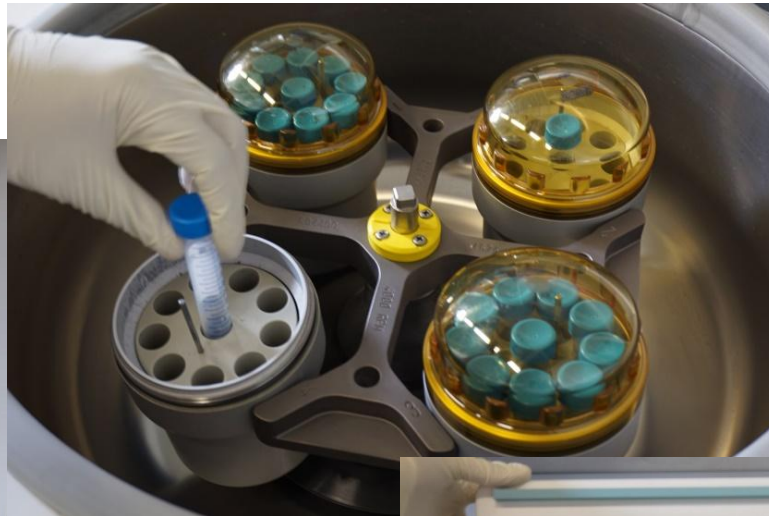
- Cloreto de 1-hexadecilpiridínio (HPC) a 1,5%
- Temperatura ambiente por 25 min



*AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 241-244, 2008.

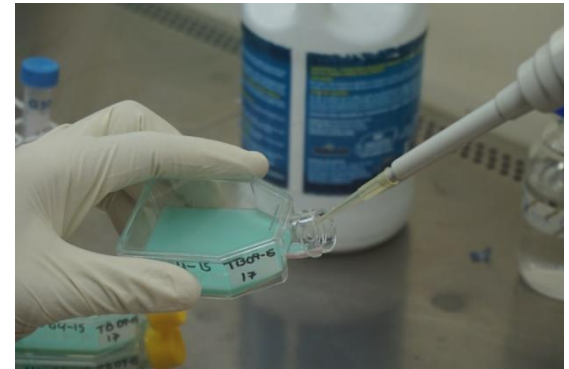
Cultivo: centrifugação

- 3.000 r.p.m. por 20 minutos



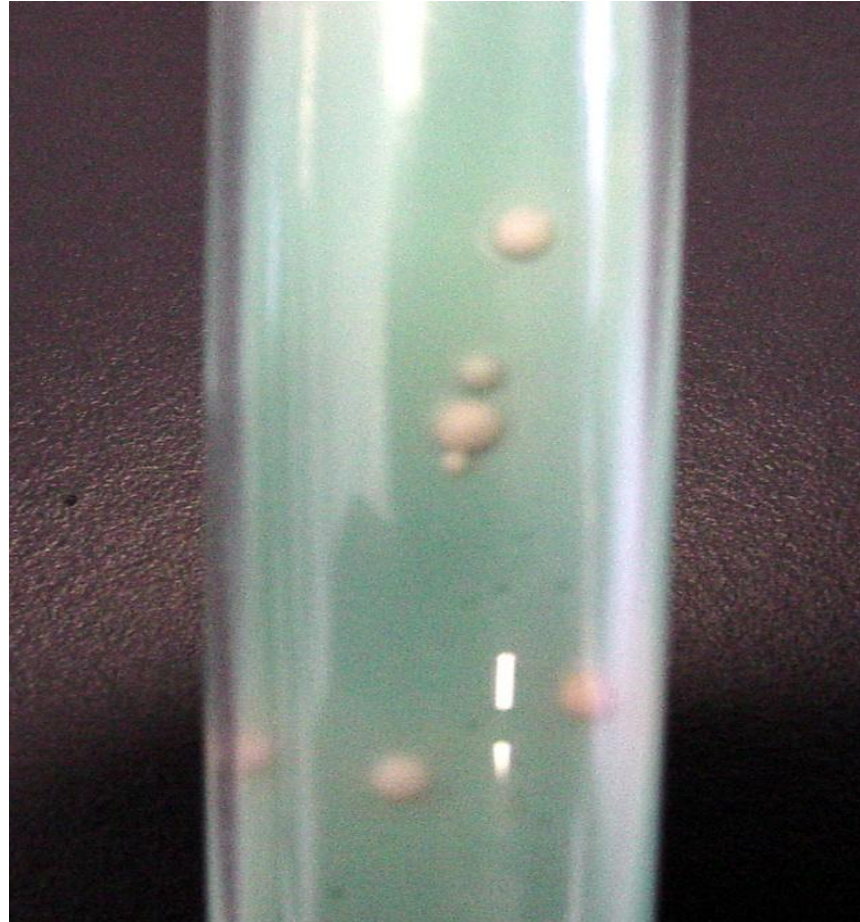
Cultivo: sementeira

- Ressuspensão com solução salina 0,85% estéril
- Meios de cultura: Stonebrink e Löwenstein-Jensen*



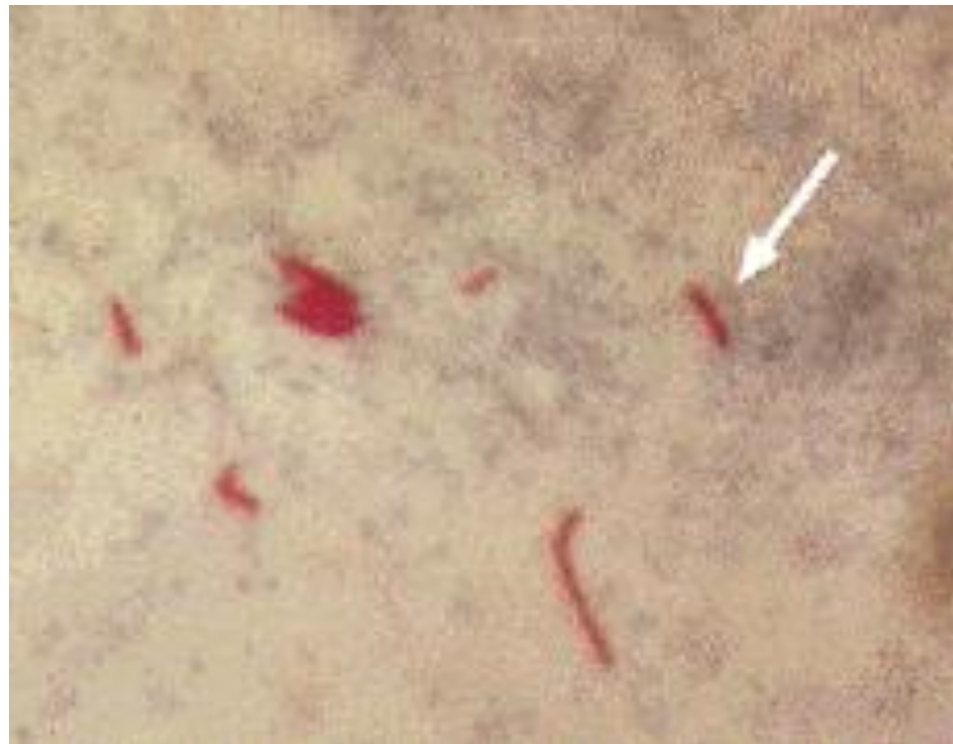
*CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Tuberculosis**. Bacteriologia de la tuberculosis: el cultivo del *Mycobacterium tuberculosis*. Buenos Aires: CPZ, 1985. (Nota técnica, n. 27).

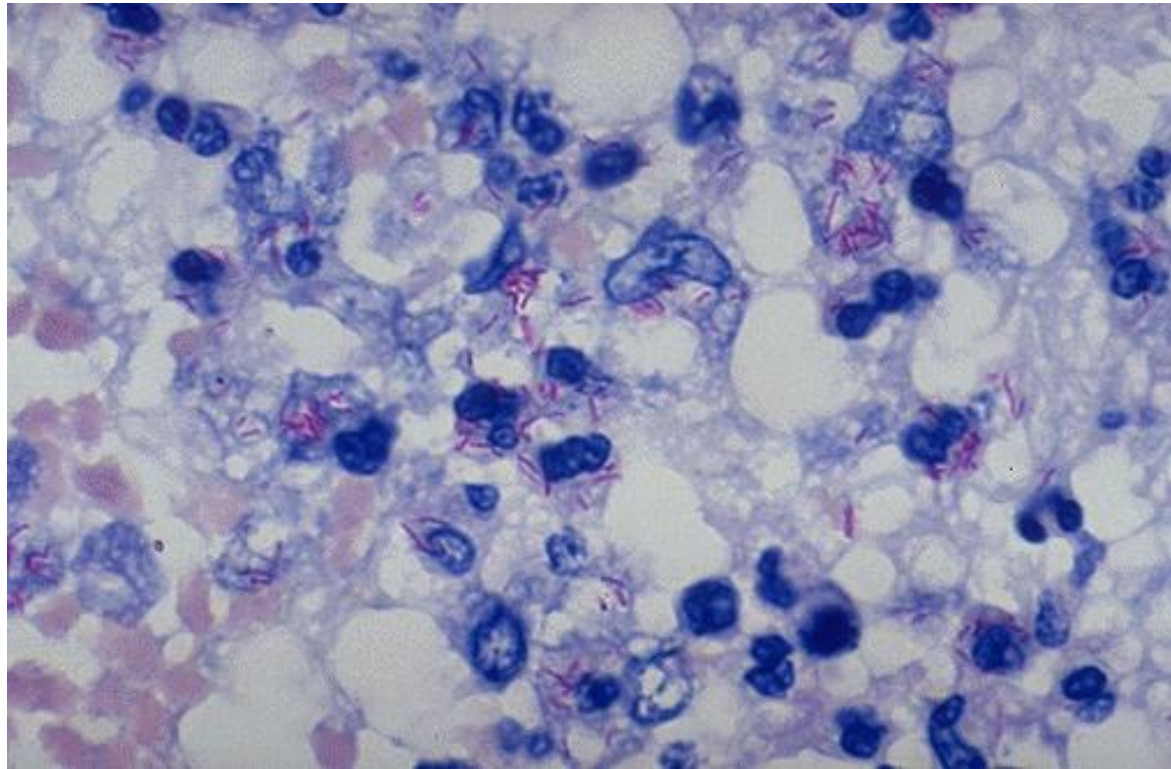
Cultivo: isolado



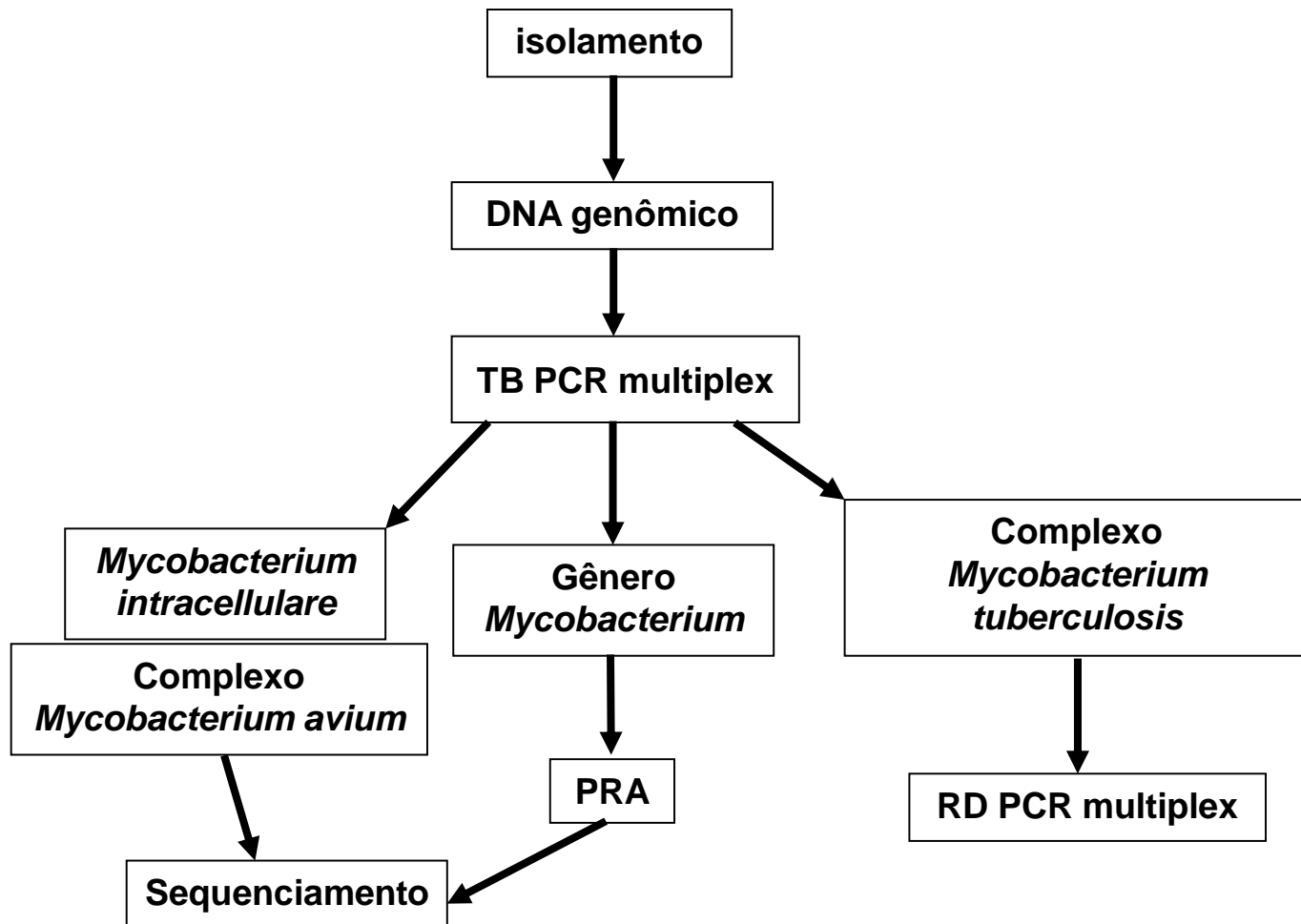
Ziehl-Neelsen

1. fuccina de Ziehl
2. álcool acidificado
3. azul de metileno/verde brilhante





Identificação Molecular: fluxograma



Identificação Molecular: extração e purificação*



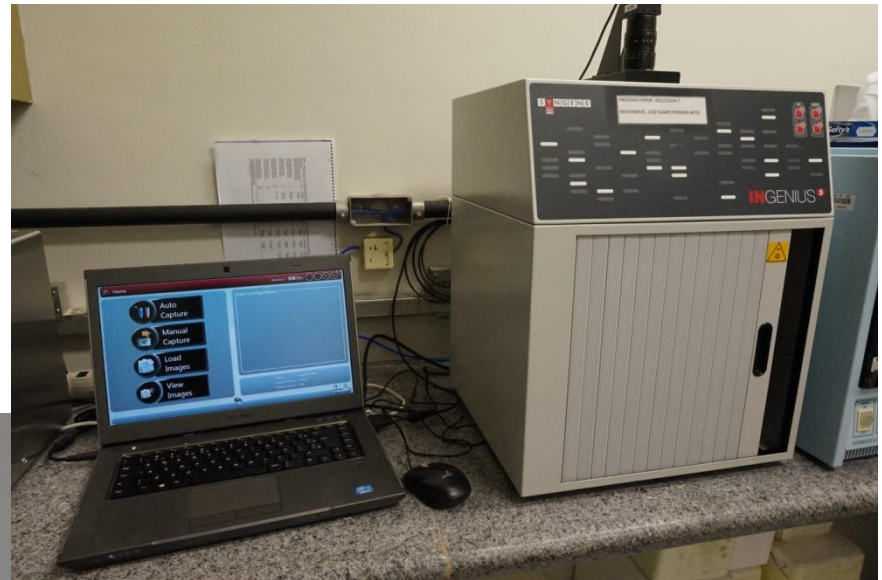
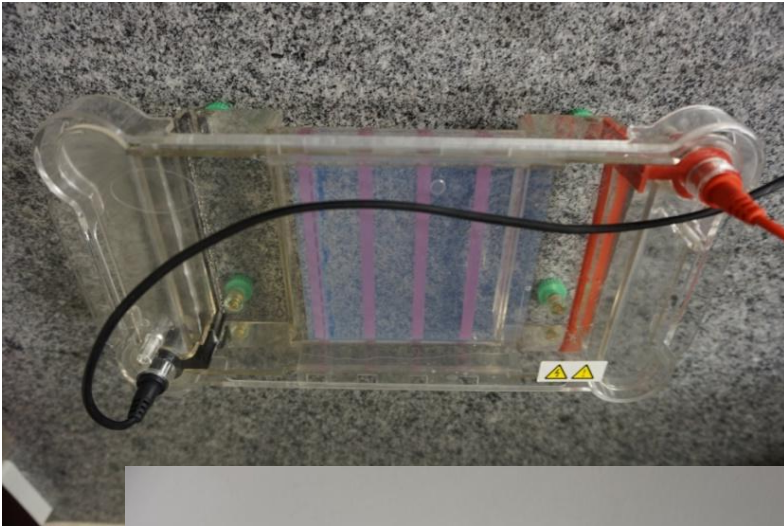
*BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. **Journal of Clinical microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2350-2351, 1999.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. W.; HERMANS P. W. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 196-205, 1994.

Identificação Molecular: amplificação

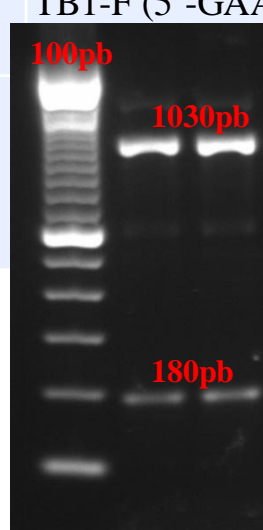
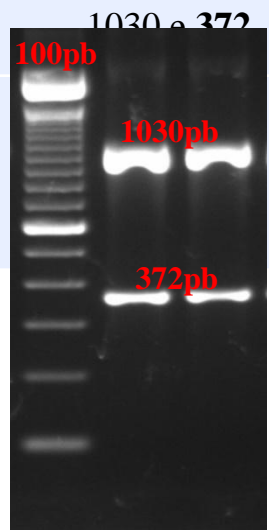
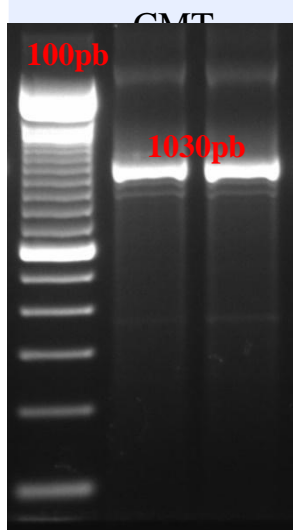


Identificação Molecular: eletroforese e visualização



Identificação Molecular: PCR TB Multiplex*

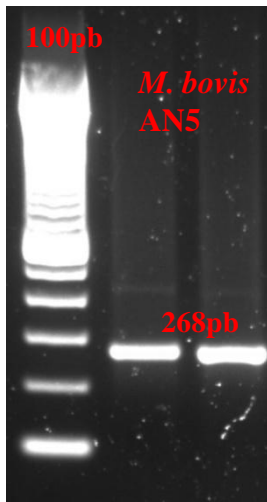
identificação	produtos amplificados (pb)	pares de "primers"	gene alvo
<i>Mycobacterium</i> spp	1030	MYCGEN-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') MYCGEN-R (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3')	16S rRNA
<i>M. intracellulare</i>	1030 e 850	MYCINT-F (5'-CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3') MYCGEN-R (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3')	16S rRNA
		TB1-F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') ACAATCCGGAGTTGACAA-3')	mpb70
		(5'-CATGCGTCTTG-3') (5'-TCCTGGCTCAG-3')	16S rRNA



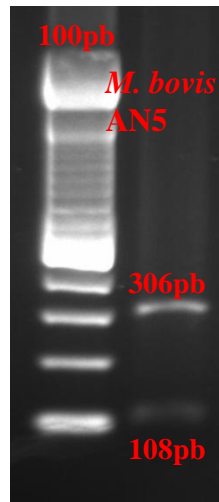
*WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. **PCR Methods and Applications**, v. 1, n. 4, p. 269-273, 1992.

Identificação Molecular: PCR RD Multiplex*

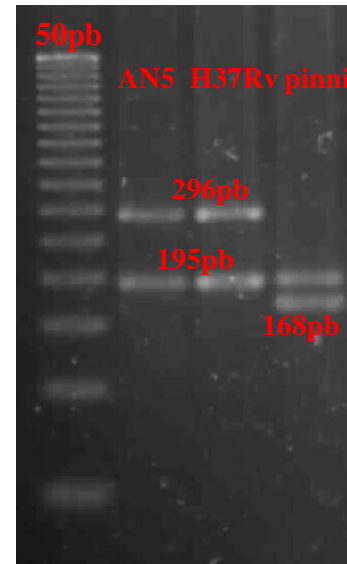
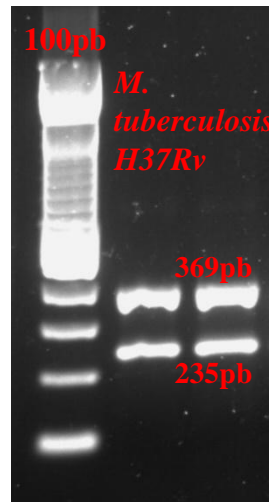
espécie	RD4	RD9	RD12	RD1 ^{mic}	RD2 ^{seal}
<i>M. bovis</i>	268bp	108bp	306bp	195bp	296bp
<i>M. tuberculosis</i>	172bp	235bp	369bp	195bp	296bp
<i>M. pinnipedii</i>	172bp	108bp	369bp	195bp	168bp
<i>M. microti</i>	172bp	108bp	369bp	127bp	296bp



RD4-1 (5'-ATGTGCGA GCTGAGCGATG-3')
RD4-2 (5'-TGTACTAT GCTGACCCATGCG-3')



RD9-1 (5'-CAAGTTGCCGTTTCGAGCC-3')
RD9-2 (5'-CAATGTTTGTGCGCTGC-3')
RD9-3 (5'-GCTACCCTCGACCAAGTGTT-3')



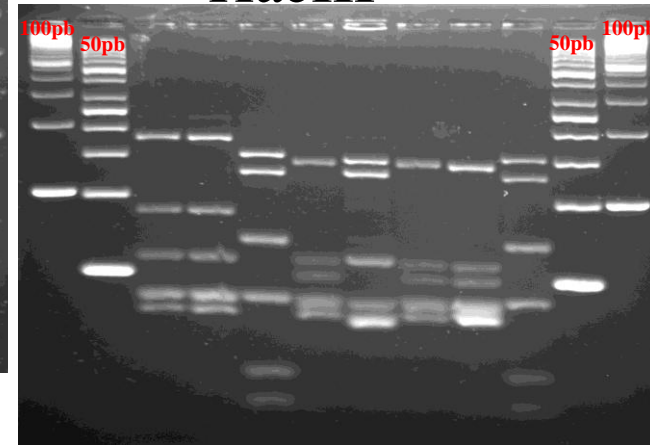
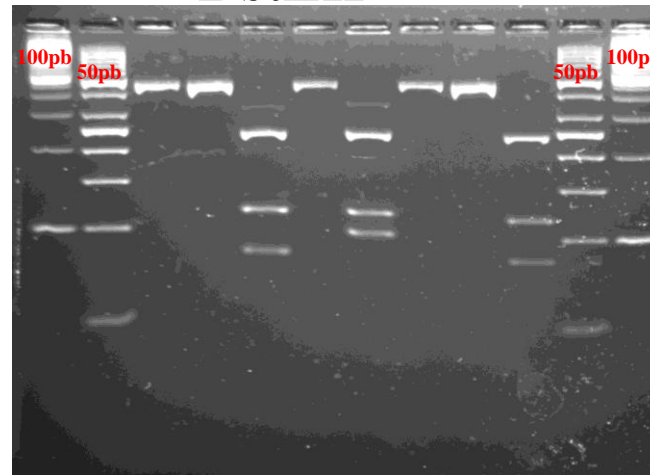
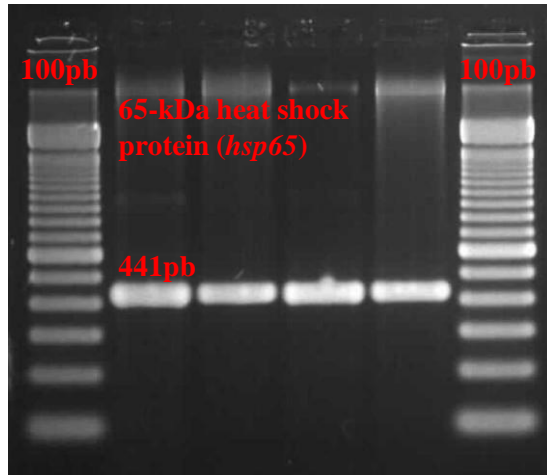
RD1^{mic}-1 (5'-CGGTTTCG TCGCTGTTCAAAC-3')
RD1^{mic}-2 (5'-CGCGTAT CGGAGACGTATTTG-3')
RD1^{mic}-3 (5'-CAATCAG CCAAGACGAGGTTG-3')

*WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. G.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M. C.; CHEGE, G. K.; VICTOR, T. C.; HOAL, E. G.; VAN HELDEN, P. D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of gene regions specific for the International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.

Identificação Molecular: PCR-Restriction Analyses (PRA)*

Enzima
BstEII

Enzima
HaeIII



Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3')
Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3')

app.chuv.ch/prasite/index.html

Mais visitados Bookshelves iCloud Plataforma de Aprendi... Academic Phrasebank Journal / Author Nam...

PRA
PRASITE

QUERY PRA DATABASE (Simplified Query Form)

Choose one of the patterns proposed in the list for each enzyme

BstEII fragments

HaeIII fragments

Submit

To enter your own values of the length of the digested fragments press "Form"

Form

Help
Method

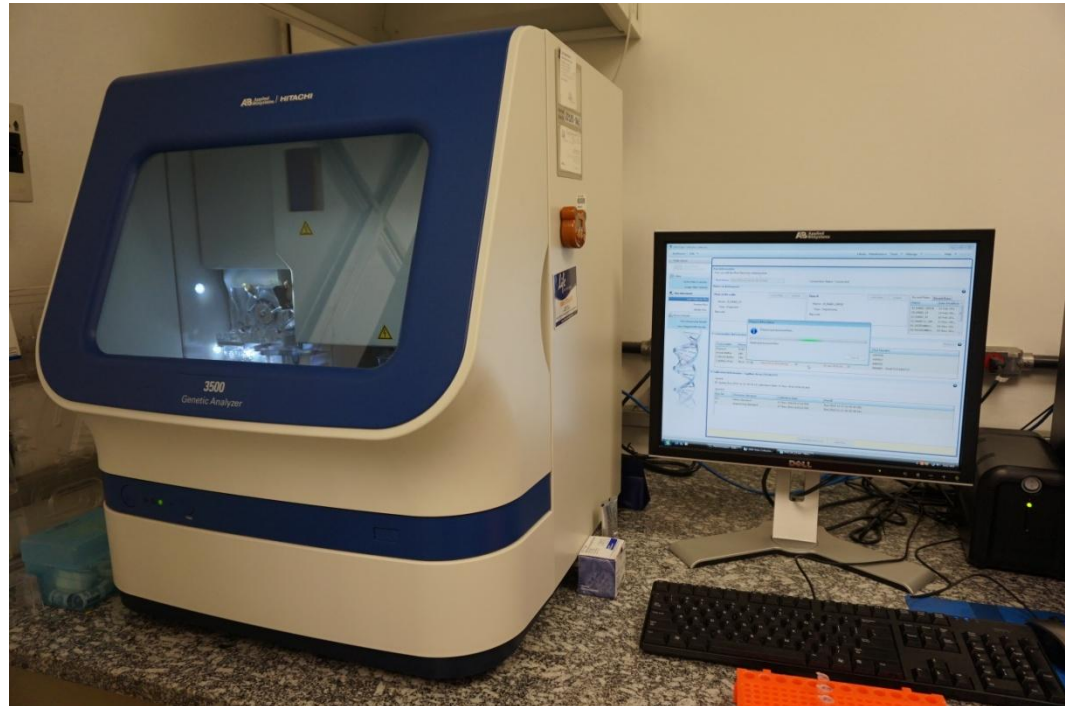
Query forms
Species names
PRA pattern

Recent results
Submission and Contact
Copyright notice
Credits

*TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

Identificação Molecular: Sequenciamento

- 16S rRNA
- 65-kDa heat shock protein (*hsp65*)
- *rpoB*



Spoligotyping

