



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Natana Maria Metinoski Bueno

Desenvolvimento e validação de um teste de ELISA baseado na proteína recombinante Mb1454 de *Mycobacterium bovis* para diagnóstico sorológico da tuberculose bovina e investigação da resposta imune em bovinos coinfectados pelo vírus da leucose bovina (BLV)

Florianópolis

2026

Natana Maria Metinoski Bueno

Desenvolvimento e validação de um teste de ELISA baseado na proteína recombinante Mb1454 de *Mycobacterium bovis* para diagnóstico sorológico da tuberculose bovina e investigação da resposta imune em bovinos coinfectados pelo vírus da leucose bovina (BLV)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto.
Coorientadores: Prof. Dr. Álvaro Menin, Prof. Dr. André Báfica.

Florianópolis

2026

Bueno, Natana Maria Metinoski

Desenvolvimento e validação de um teste de ELISA baseado na proteína recombinante Mb1454 de Mycobacterium bovis para diagnóstico sorológico da tuberculose bovina e investigação da resposta imune em bovinos coinfectados pelo vírus da leucose bovina (BLV) / Natana Maria Metinoski Bueno ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto, coorientador, Álvaro Menin, coorientador, André Luiz Barbosa Báfica, 2025.

139 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. M. bovis. 3. ELISA. 4. Coinfecção. 5. Leucose Enzoótica Bovina. I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Menin, Álvaro . III. Báfica, André Luiz Barbosa IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. V. Título.

Natana Maria Metinoski Bueno

Título: Desenvolvimento e validação de um teste de ELISA baseado na proteína recombinante Mb1454 de *Mycobacterium bovis* para diagnóstico sorológico da tuberculose bovina e investigação da resposta imune em bovinos coinfectados pelo vírus da leucose bovina (BLV)

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 27 de novembro de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

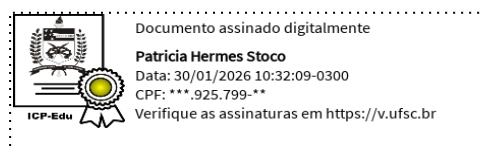
Prof. Álvaro Menin, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina
Presidente

Profa. Patrícia Hermes Stoco, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro interno

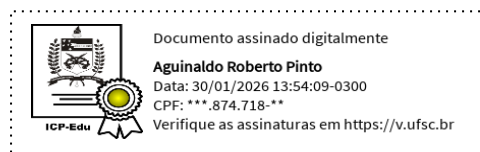
Profa. Renata Cristina Fleith, Dra.
Pirbright Institute, Reino Unido
Membro externo

Prof. Vagner Miranda Portes, Dr.
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
Membro externo

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Orientador

Florianópolis, 2026.

A Deus pela vida e família.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A minha família, especialmente minha mãe Terezinha e irmãs Janaina e Bruna.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, pela orientação e dedicação, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Álvaro Menin, pela grande ajuda, valiosas contribuições e paciência.

Ao meu coorientador Prof. Dr. André Báfica, pela oportunidade de aprendizado, valiosos ensinamentos e contribuições.

A UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade.

Aos professores que aceitaram compor a banca de qualificação.

Aos colegas de laboratório, pela parceria, colaboração e aprendizado.

Ao Vertá Laboratórios pelas amostras cedidas.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Agradeço a todos envolvidos direta e indiretamente na realização deste trabalho.

RESUMO

A tuberculose bovina (bTB) é uma doença infecciosa de natureza zoonótica que persiste apesar dos esforços para seu controle e erradicação. A ausência de métodos diagnósticos que detectem eficientemente o *M. bovis* contribui significativamente para esse cenário. Em regiões com alta prevalência de bTB, coinfeções com o vírus da leucose bovina (BLV) podem alterar a resposta imune adaptativa, dificultando o diagnóstico preciso da bTB. Neste trabalho foi desenvolvido um novo teste de ELISA baseado na proteína recombinante Mb1454, com vistas a facilitar a detecção da bTB, oferecendo resultados mais rápidos, precisos e acessíveis. A análise do ELISA-Mb1454 utilizando amostras de soro de bovinos infectados (positivos em três critérios diagnósticos: teste de tuberculinização cervical comparativo (SICTT), presença de lesões macroscópicas compatíveis com bTB e isolamento de *M. bovis* por cultura bacteriana; n = 113) e bovinos não infectados (negativos para SICTT, lesões macroscópicas e cultura *M. bovis*; n = 120) apresentou sensibilidade de 92,9% e especificidade de 90,0%, com acurácia de teste de 91,3%, indicando alta capacidade de discriminação entre amostras positivas e negativas para o *M. bovis* ($p < 0,0001$). Apoiando essa hipótese, foi investigado se a coinfeção pelo vírus da leucose bovina (BLV), um dos principais patógenos bovinos, influencia na sensibilidade dos testes imunológicos para bTB. Os resultados demonstraram que bovinos infectados por BLV com linfocitose persistente (BLV/LP), quando expostos a antígenos micobacterianos, apresentam resposta reduzida de hipersensibilidade do tipo retardada (DTH) ao PPD-*M. bovis* ($p < 0,05$) e teste ELISA ($p < 0,05$), o que pode prejudicar programas de controle e erradicação da bTB.

Palavras-chave: *M. bovis*; ELISA; coinfeção; Leucose Enzoótica Bovina; DTH.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (BTB) is a zoonotic infectious disease that persists despite efforts to control and eradicate it. The lack of diagnostic methods that efficiently detect *M. bovis* contributes significantly to this situation. In regions with a high prevalence of bTB, coinfections with bovine leukosis virus (BLV) can alter the adaptive immune response, hindering accurate bTB diagnosis. In this study, a new ELISA test based on the recombinant protein Mb1454 was developed to facilitate bTB detection, offering faster, more accurate, and accessible results. ELISA-Mb1454 analysis using serum samples from infected cattle (positive in three diagnostic criteria: comparative cervical tuberculin skin test (SICTT), presence of macroscopic lesions compatible with bTB, and isolation of *M. bovis* by bacterial culture; n = 113) and uninfected cattle (negative for SICTT, macroscopic lesions, and *M. bovis* culture; n = 120) showed a sensitivity of 92.9% and a specificity of 90.0%, with a test accuracy of 91.3%, indicating a high capacity to discriminate between samples positive and negative for *M. bovis* ($p < 0.0001$). Supporting this hypothesis, we investigated whether coinfection with bovine leukosis virus (BLV), a major bovine pathogen, influences the sensitivity of immunological tests for bTB. The results showed that cattle infected with BLV with persistent lymphocytosis (BLV/LP), when exposed to mycobacterial antigens, presented a reduced delayed-type hypersensitivity (DTH) response to PPD-*M. bovis* ($p < 0.05$) and ELISA test ($p < 0.05$), which may impair TB control and eradication programs.

Keywords: *M. bovis*; ELISA; coinfection; Enzootic Bovine Leukosis; DTH.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 Vias de transmissão do <i>Mycobacterium bovis</i>	25
Figura 1.2 Detecção da resposta imune na infecção por <i>Mycobacterium bovis</i>	36

CAPÍTULO 2

Figure 2.1 Identification of Mb1454 protein.....	87
Figure 2.2 ELISA-Mb1454 standardization.....	90
Figure 2.3 Diagnostic performance of ELISA-Mb1454 and IDEXX <i>M. bovis</i> Ab test (IDEXX Ab test).....	91

CAPÍTULO 3

Figure 3.1 Bovine leukosis virus (BLV) infection exacerbates <i>Mycobacterium bovis</i> -mediated pathology severity and impairs humoral responses.....	107
Figure 3.2 Altered granulomatous responses in the lungs and lymph nodes of cattle naturally coinfecting with <i>Mycobacterium bovis</i> and bovine leukosis virus (BLV).....	109
Figure 3.3 Bovine leukosis virus (BLV)-infected cattle with persistent lymphocytosis display impaired DTH responses to mycobacterial antigens.....	110

LISTA DE TABELAS

Table 2.1 Performance of the ELISA-Mb1454 and IDEXX *M. bovis* Ab test (IDEXX Ab test).....90

Table 2.2 Confusion matrix for ELISA-Mb1454.....93

..

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Beta-lactamases AmpC
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
AUC	Area Sob a Curva ROC
BCG	Bacillus Calmette- Guerin
bTB	Tuberculose Bovina
BLV	Vírus da Leucose Bovina
CD80	Grupo de Diferenciação 80
CD83	Grupo de Diferenciação 83
CFP-10	<i>Culture Filtrate Protein 10-kDa</i>
DTH	Hipersensibilidade da Tipo Retardada
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ESAT-6	Target 6-kDa
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN-γ	Interferon Gama
IGRA	Ensaio de Liberação de IFN- γ
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina – 2
IL-4	Interleucina – 4
IL-10	Interleucina -10
IL-12	Interleucina -12
IMC	Imunidade Mediada por Células
LAM	Lipoarabinomanano
LEB	Leucose Enzoótica Bovina
LP	Linfocitose Persistente
TB	Tuberculose Humana
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLV	Carga Proviral
PPD	Derivado Proteico Purificado
PPD-A	Derivado Proteico Purificado Aviário
PPD-B	Derivado Proteico Purificado Bovino
MAC	<i>Complexo Mycobacterium avium</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
MPB70	Proteína de <i>M.bovis</i> de 24 kDa
MPB83	Proteína de <i>M.bovis</i> de 26 kDa
MTC	<i>Complexo Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Células Natural Killer
RDs	Regiões de Diferença
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
TCD4⁺	Linfócitos TCD4 ⁺
TCD8⁺	Linfócitos TCD8 ⁺

TDM	Trealose Dimicolato
Th1	Resposta T helper 1
Th2	Resposta T helper 2
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
T $\gamma\delta$	Células T gama delta
UE	União Européia
SICTT	Teste de Tuberculinização Cervical Comparativo
SMTL-13	Lectina secretada de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de 13 kDa
WOAH	Organização Mundial de Saúde Animal

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução geral.....	17
1.1 Etiologia da tuberculose bovina.....	18
1.2 Cenário da tuberculose bovina no Brasil e no mundo	19
1.3 Imunopatologia da tuberculose bovina	21
1.4 Transmissão da tuberculose bovina.	23
1.5 Coinfecção entre <i>Mycobacterium bovis</i> e vírus da leucose bovina (BLV).....	25
1.6 Etiologia da leucose enzoótica bovina (LEB).....	27
1.7 Histórico e prevalência da leucose enzoótica bovina.....	28
1.8 Transmissão do BLV.....	29
1.9 Diagnóstico da leucose enzoótica bovina.....	29
1.10 Coinfecção entre bTB/BLV e resposta DHT.....	30
1.11 Diagnóstico da tuberculose bovina	31
1.11.1 <i>Teste de tuberculinização cervical comparativo (SICTT)</i>	31
1.11.2 <i>Diagnóstico histopatológico</i>	33
1.11.3 <i>Isolamento bacteriano</i>	33
1.11.4 <i>Diagnóstico Molecular</i>	34
1.11.5 <i>Ensaio de liberação de IFN-γ (IGRA)</i>	35
1.11.6 <i>Proteínas imunogênicas utilizados no desenvolvimento de testes de ELISA para detecção de anticorpos anti-M. Bovis</i>	37
1.12 Hipótese	40
1.13 Objetivo.	41
1.13.1 <i>Objetivo geral</i>	41
1.13.2 <i>Objetivos específicos</i>	41
1.14 Referências.....	42
CAPÍTULO 2 - Development and evaluation of an ELISA based on recombinant Mb1454 antigen for the detection of specific anti-<i>Mycobacterium bovis</i> antibodies in cattle.....	80
2.1 Abstract.....	81
2.2 Introduction.....	81
2.3 Materials and Methods.....	82
2.3.1 <i>Ethical approval</i>	83
2.3.2 <i>Animals and M. bovis infection diagnostic</i>	83
2.3.3 <i>Expression, purification, and immunogenic evaluation of recombinant Mb1454-M.</i>	

<i>bovis</i> protein.....	84
2.3.4 Standardization of the ELISA assay using recombinant Mb1454 antigen.....	85
2.3.5 IDEXX <i>M.bovis</i> antibody ELISA test.....	86
2.3.6 Post-mortem examination and pathological analysis.....	86
2.3.7 Statistical analyses.....	87
2.4 Results.....	87
2.4.1 Evaluation of the expression and immunogenicity of the Mb1454 protein.....	87
2.4.2 Optimization of ELISA-Mb1454.....	88
2.4.3 Correlation between levels of anti- <i>M. bovis</i> antibodies and histopathological staging of bTB lesions using ELISA-Mb1454 and IDEXX <i>M. bovis</i> Ab test.....	93
2.5 Discussion.....	94
2.6 CRediT authorship contribution statement.....	97
2.7 Funding.....	97
2.8 Acknowledgements.....	98
2.9 Results.....	98
CAPÍTULO 3 - BLV coinfection impairs immunity and diagnostics in bovine tuberculosis.....	104
3.1 Abstract.....	105
3.2 Introduction.....	105
3.3 Results.....	106
3.3.1 BLV infection exacerbates <i>M. bovis</i> -associated disease severity in cattle.....	106
3.3.2 BLV alters granuloma responses to natural <i>M. bovis</i> infection in cattle.....	109
3.3.3 BLV impairs delayed-type hypersensitivity responses to mycobacterial antigens in cattle.....	110
3.4 Discussion.....	111
3.5 Methods.....	114
3.5.1 Animals.....	114
3.5.2 Bacteriological culture and identification of <i>M. bovis</i> isolates.....	114
3.5.3 Identification of BLV coinfection and hematological analysis.....	115
3.5.4 Postmortem examination.....	116
3.5.5 Histopathological and histomorphological analysis.....	117
3.5.6 Experimental analysis of the DTH.....	117
3.5.7 Humoral responses against <i>M. bovis</i>	118
3.5.8 Statistical analysis.....	118
3.6 Data availability	118

3.7 References.....	119
3.8 Acknowledgements.....	123
3.9 Author contributions.....	123
CAPÍTULO 4 – Discussão geral	124
4.1 Conclusão	130
4.2 Referências	131

Introdução geral

1.1 Etiologia da tuberculose bovina

A tuberculose bovina (bTB) é uma doença endêmica no Brasil e uma importante infecção antroponozoonótica de distribuição mundial (Dametto et al., 2020), que causa perdas econômicas significativas (Ramanujam & Palaniyandi., 2023) e sérios problemas de saúde pública, pertencendo ao grupo de doenças de notificação compulsória pela Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) (Bezoz et al., 2023). Essa doença crônica debilitante tem como principal agente etiológico o bacilo *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*) que foi identificado por Smith em 1898 como uma espécie diferente do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), bacilo causador da tuberculose humana (TB), considerada a maior causa de mortalidade humana nos últimos 200 anos (Elsayed & Amer, 2019;). A bTB é uma doença antiga e disseminada por todo o mundo. Há relatos da bTB na costa do Mediterrâneo antes de se espalhar do norte da Itália para a Europa Ocidental e Grã-Bretanha. Posteriormente, os bovinos infectados foram distribuídos para vários países (Giusti, 2024; Marianelli, 2023) embora ainda cause danos em países desenvolvidos como Estados Unidos da América (EUA), Austrália e Europa, sendo cada vez mais importante em países em desenvolvimento (Fielding et al., 2021).

Mycobacterium bovis pertence ao grupo de bactérias patogênicas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e, juntamente com *M. tuberculosis*, é uma das principais causas da TB (Kasir et al., 2023). *Mycobacterium bovis* infecta predominantemente bovinos, mas tem uma ampla gama de hospedeiros, incluindo seres humanos, animais selvagens e domésticos (Santos et al., 2022; Ramanujam & Palaniyandi, 2023). Além do *M. bovis* e *M. tuberculosis*, o MTBC inclui espécies como *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium mungi*. Esses patógenos compartilham até 99,9% de similaridade nucleotídica e a sequência 16SrRNA (Egbe et al., 2017; Zahran et al., 2023). Recentemente, um novo quadro de infecção por TB foi estabelecido com novos casos relatados causados pelo agente etiológico *Mycobacterium orygis*, uma subespécie do MTBC em bovinos e humanos, com casos relatados na Índia, Paquistão, Bangladesh e Nepal (Rahim et al., 2017). Os casos de TB em humanos associados à infecção por *M. bovis* e *M. tuberculosis* são clinicamente indistinguíveis (Torres-Gonzalez et al., 2016), sendo que a metodologia comumente utilizada para o diagnóstico de TB (microscopia de esfregaço de escarro) não é capaz de diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis* (Usabiaga, 2001). Assim, durante o

diagnóstico de casos suspeitos de TB, a diferenciação do agente etiológico não é realizada (Davidson, et al., 2017), o que provavelmente leva a uma possível subnotificação do número de casos da TB causada por *M. bovis*, o qual são relatados apenas como TB humana (Perez-Lago, et al. 2014; WOA, 2018).

A TB é causada por micobactérias aeróbicas estritas na forma de bastonetes imóveis, que não formam esporos e nem possuem cápsulas ou flagelos. Possuem paredes celulares ricas em lipídios e polipeptídeos, que são comuns em bactérias Gram-positivas, álcool-ácido resistentes (Nava-Vargas et al., 2021). A capacidade de sobrevivência desses bacilos está diretamente relacionada à complexidade da parede celular; o alto teor lipídico é responsável pela antigenicidade e formação de granulomas, além de outros efeitos importantes causados no hospedeiro (Kuria, 2019).

Dependendo da temperatura, luz e umidade do ambiente, a sobrevivência do bacilo *M. bovis* pode variar de alguns dias a dois anos (Broughan et al., 2016). Em condições normais, ele pode sobreviver no solo por pelo menos 6 meses. Ambientes frios, úmidos e escuros são mais propícios à sobrevivência do bacilo; temperaturas acima de 65 °C e luz ultravioleta causam a morte do *M. bovis*, que também pode ser morto pela exposição prolongada ao calor, seca e luz solar (Allen et al., 2021).

1.2 Cenário da tuberculose bovina no Brasil e no mundo

Segundo a WOA, estima-se que mais de 12.000 pessoas morrem anualmente de tuberculose zoonótica causada pelo *M. bovis* (Algammal et al., 2019; WOA, 2020; Getahun et al., 2020), sendo 10% a 15% dos casos de TB humana (30% dos casos em áreas rurais) causados por *M. bovis*. No entanto, as estatísticas globais são imprecisas devido à falta de informações confiáveis do sistema de vigilância em saúde, especialmente em países onde a TB é endêmica (Bezoz et al., 2023). Além dos problemas de saúde pública (Boggiatto et al., 2021), a infecção por *M. bovis* causa também perdas econômicas diretas (Allen et al., 2018; Rahman et al., 2020). Com aproximadamente 50 milhões de bovinos infectados no mundo, estima-se um prejuízo anual de 3 bilhões de dólares (Srinivasan et al., 2021), relacionados principalmente, à redução da produtividade de animais infectados e restrições comerciais, além de dificultar a exportação de produtos de origem animal (Olea-Popelka et al., 2017; Ameni et al., 2018). Um bovino infectado pode apresentar redução de 10 a 25% na produção de leite (Bolaños et al., 2017; Brahma et al., 2019), além de ser fonte de infecção para outros animais e humanos (Lima et al., 2021). Estima-se que as perdas por abate por bTB podem representar de 30% a

50% da diferença entre o valor de mercado do gado leiteiro ou de corte e seu valor de abate (Pérez- Morote et al., 2020).

Importantes fatores contribuem para o desconhecimento do real cenário da infecção por *M. bovis* no Brasil, sendo a falta de um diagnóstico confiável e preciso um dos principais. Em países considerados em desenvolvimento, a bTB tem impactos ainda maiores na economia e na saúde pública (Little, 2019). As maiores prevalências de bTB foram relatadas na Índia (7,3%), seguida do Brasil (2,5%) e China (2,4%) (Gong et al., 2021; Rodrigues et al., 2022; Ramanujam & Palaniyandi, 2023). Na África, 82% das pessoas e 85% dos bovinos residem em regiões onde a bTB é encontrada (Ghebremariam et al., 2016). Entre 2019 e 2022, aproximadamente 158 países implementaram medidas de controle para prevenir a tuberculose animal, 62 deles usando a estratégia de “teste e abate” para bovinos (Byrne, 2022).

No Brasil, em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), visando a erradicação e redução do número de casos da brucelose e bTB, onde o tratamento de bovinos infectados com bTB não é autorizado, sendo o abate de animais positivos a única medida para eliminação do agente dos rebanhos (Borham et al., 2022). Posteriormente, em 2017, o teste de tuberculinização cervical comparativo (SICTT) foi definido como diagnóstico oficial da tuberculose animal (Brasil, 2017). Duas décadas após a implementação do PNCEBT no Brasil, o programa trouxe ações estruturais e maior quantidade de informações epidemiológicas, antes extremamente escassas, permitindo melhor mapeamento e contribuindo para a adoção de estratégias de prevenção, controle e erradicação (Ferreira-Neto et al., 2021). A implementação de programas de controle da bTB contribui para a redução do número de casos da doença, principalmente em países desenvolvidos (Mitchell et al., 2022), porém dentro de um mesmo país, há variações regionais na prevalência da bTB (Khairullah et al., 2024). Locais com alta produção de leite próximos às grandes cidades apresentam maior incidência da bTB (Avila et al., 2018).

Ferreira-Neto et al. (2016), em estudo realizado no Brasil, relatam maior prevalência da bTB em estados que fazem parte do “cinturão leiteiro”, compreendendo Espírito Santo, norte de São Paulo, sul de Minas Gerais e centro-leste de Goiás. As taxas de prevalência da bTB são maiores para a produção de gado leiteiro (Zhu et al., 2023). Portanto, a infecção por *M. bovis* é maior em rebanhos leiteiros, notadamente aqueles de alta produção, sendo a introdução de bovinos não testados o principal fator de risco associado à disseminação da bTB. Assim, estados que buscam erradicar o bTB precisam investir em estratégias para detectar e mitigar rebanhos

infectados por *M. bovis* (Byrne et al., 2022).

A Índia é considerada um dos países com maior número de rebanhos de bovinos infectados com bTB, com prevalência estimada de 7,3% (Ramanujam & Palaniyandi, 2023). Na Europa, a situação da bTB melhorou, mas não significativamente, adquirindo um caráter heterogêneo (Bezoz et al., 2023). Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) e o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), entre 2012 e 2021, houve uma redução de 47,5% no número total de rebanhos bovinos infectados, mas a prevalência de bTB baixou apenas 4,2%. Isso pode ser atribuído a vários fatores, incluindo a saída do Reino Unido da União Europeia (UE); redução dos rebanhos; e as condições ambientais que dificultam o processo de erradicação em locais onde a bTB é endêmica (EFSA, 2023). Bezerra Neto et al. (2024) utilizaram meta-análise para avaliar a situação epidemiológica da bTB no mundo. Através do SICTT obtiveram prevalência global de bTB de 3,27% (2,11–5,05%) para animais e 18,09% (11,20–27,90%) para rebanhos, porém, devido à heterogeneidade dos trabalhos utilizados no estudo, os autores sugerem a inclusão de novos testes diagnósticos combinados ao SICTT para identificar um maior número de animais infectados pela bTB.

1.3 Imunopatologia da tuberculose bovina

A imunopatologia da bTB assemelha-se à TB humana em vários aspectos (Stavinohova et al., 2019), de modo que bovinos têm sido utilizados como modelo para estudar a TB em humanos (Waters et al., 2015). A maioria dos bacilos de *M. bovis*, quando inalados, permanecem no trato respiratório superior (Kawka et al., 2023) e são posteriormente fagocitados por macrófagos alveolares, onde sofrem replicação intracelular (Maphasa et al., 2021) e induzem a produção de citocinas e quimiocinas (Cicchese et al., 2018). Além de macrófagos, células dendríticas, células T gama delta (T $\gamma\delta$), células natural killer (NK) e neutrófilos também apresentam a resposta inicial contra micobactérias (Baldwin et al., 2015; Pollock et al., 2001; Barletta & Steffen, 2017).

No contato entre *M. bovis* com células apresentadoras de antígenos (APCs), ocorre sinalização e expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, aumentando a ativação de células imunes inatas (Cicchese et al., 2018). Simultaneamente, APCs migram do pulmão para os linfonodos, onde apresentam antígenos para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, que por sua vez migram para o local da infecção, induzindo uma resposta inflamatória granulomatosa

local, resultando em remodelação tecidual e formação de granuloma (Carrisoza-Urbina et al., 2019). Na presença de citocinas como IL-12, ocorre expressão de interferon gama (IFN- γ) e expansão de células Th1 (Teixeira et al., 2007; Barletta & Steffen, 2017), que quando ativadas secretam IL-2 e IFN- γ . Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, a diferenciação de células CD4⁺ em células Th1 pode não ocorrer. Macrófagos ativados também podem secretar IL-10 e IL-4 em vez de IL-12, levando à diferenciação de linfócitos CD4⁺ para o fenótipo Th2.

Na tentativa de conter os macrófagos infectados pela resposta inflamatória causada pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, ocorre a formação de granulomas (Carrisoza-Urbina et al., 2019). As células T $\gamma\delta$ também desempenham um papel importante na formação de granulomas (Blanco et al., 2021). Os granulomas são lesões características do bTB que atuam como uma barreira confinando e impedindo a propagação de micobactérias para diferentes tecidos, representando a interface hospedeiro-patógeno (Lin et al., 2013; Gideon et al., 2016). Estudos com infecções experimentais em bovinos classificaram os granulomas em quatro estágios (I-IV) de acordo com o tamanho, composição celular, presença ou ausência de necrose, fibrose e mineralização (Wangoo et al., 2005; Aranday-Cortes et al., 2013).

Os granulomas desempenham um papel crucial na fisiologia das infecções micobacterianas (Hamed et al., 2023) e podem ser um ambiente favorável para a replicação de micobactérias (Cicchese et al., 2018). Assim, à medida que o granuloma se desenvolve, a quantidade e a localização dos macrófagos mudam. Nos granulomas de estágio I e II, eles são abundantes; no entanto, nos granulomas de estágio III e IV, os macrófagos são menos numerosos e estão localizados mais internamente (Aranday-Cortes et al., 2013). Dentro do granuloma, as micobactérias podem ser eliminadas rapidamente por macrófagos ativados em um ambiente pró-inflamatório, ou lentamente se o ambiente for anti-inflamatório, mantendo a integridade do tecido (Italiani & Boraschi, 2014).

A capacidade do *M. bovis* de sobreviver e proliferar dentro do hospedeiro determina o desenvolvimento da doença (Zhai et al., 2019). A virulência do *Mycobacterium* se deve principalmente à composição da parede celular, constituída por ceras, beta-lactamases AmpC (AMPc), trealose dimicolato (TDM), lipoarabinomanano (LAM), peptidoglicano e glicolipídios (Rahlwes et al., 2023). O TDM é capaz de induzir maior produção de citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de induzir um recrutamento mais intenso de neutrófilos (Geisel et al., 2005). O ácido micólico presente na parede celular também auxilia na formação da resposta imune do hospedeiro e no aparecimento de lesões (Smith et al., 2021), sendo que os lipídios de superfície parecem induzir a imunidade inata (Ghazaei, 2018).

1.4 Transmissão da tuberculose bovina

O processo de globalização e ocupação humana contribuiu para o aumento da complexidade da história natural da bTB no mundo. As interações entre animais, humanos e meio ambiente são de fundamental importância na transmissão da doença. Vários elementos impactam o processo de transmissão, incluindo características da bactéria e do hospedeiro, virulência do agente, exposição a animais doentes e humanos, existência de programas de controle, entre outras variáveis (Allen et al., 2021).

Em diferentes espécies, *M. bovis* causa uma doença de natureza respiratória (Mohamed, 2019). A transmissão em bovinos geralmente ocorre por contato direto com animais infectados, uma vez que o bacilo pode ser excretado em gotículas, saliva, leite, urina, fezes, sêmen e descargas de linfonodos periféricos abertos (Constable et al., 2016). A localização e a aparência das lesões da bTB estão correlacionadas com a via de infecção, sendo a inalação considerada a principal via de infecção por *M. bovis* (Borham et al., 2022). Pulmão, nasofaringe e linfonodos associados, mucosa orofaríngea e linfonodos retrofaríngeos são os órgãos mais comumente afetados porque as vias aéreas e orofaríngeas são as vias mais importantes de infecção (Tulu et al., 2021). A transmissão através da água, pastagens e alimentos contaminados também adquirem importância na transmissão da bTB, que também pode ser transmitida por via transplacentária, por meio do coito, amamentação ou lesões.

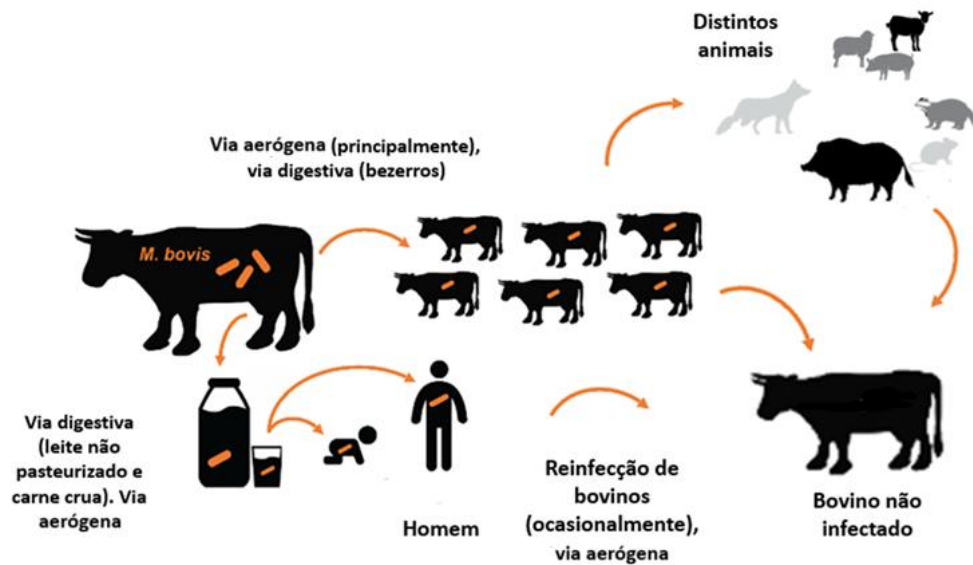
A transmissão de *M. bovis* de bovinos para o homem ocorre principalmente pelo consumo de leite e carne contaminados que não receberam nenhum tratamento térmico, principalmente associados ao abate clandestino e ao abate realizado em matadouros que não atendem às normas de inspeção sanitária (Woah; Fao, 2017). No entanto, o contato direto é importante para pessoas que trabalham com confinamento de bovinos (Bapat et al., 2017). Esses trabalhadores podem desenvolver tuberculose pulmonar devido à maior probabilidade de inalar aerossóis contaminados (Torres- Gonzalez et al., 2016).

Em regiões onde a TB é endêmica, a infecção de bovinos por *M. tuberculosis* é considerada acidental e pode ocorrer em animais que vivem com humanos infectados (Bhembe et al., 2017). Indivíduos com TB ativa seriam as principais fontes de transmissão de *M. tuberculosis* para bovinos. Essa transmissão ocorre principalmente pela inalação de aerossóis ou alimentos contaminados com secreções e excretas de humanos com TB ativa (Ameni et al., 2010; Sweetline et al., 2017). Recentemente, isolados de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina e isoniazida, utilizados no tratamento da TB, foram isolados de bovinos na Índia,

indicando a ocorrência de zoonose reversa (antropozoonose) (Sweetline et al., 2019; Kock et al., 2021). Entretanto, os dados epidemiológicos disponíveis para tuberculose zoonótica não representam com precisão a verdadeira incidência da doença. É comum que a prevalência do vírus da imunodeficiência humana (HIV) seja alta em regiões onde a TB é endêmica, o que afeta as proporções relacionadas aos casos de TB humana causados por *M. bovis* (Olea-Popelka et al., 2017). Em humanos, a infecção causada por *M. bovis* é geralmente extrapulmonar e a estrutura caseosa dos granulomas em indivíduos imunossuprimidos pode ser perdida, tornando o diagnóstico correto ainda mais difícil (Capoferri et al., 2025).

Diferentes animais, tanto selvagens quanto domésticos, podem servir como reservatórios para o *M. bovis*, contribuindo para a manutenção e reintrodução da bTB em rebanhos bovinos (Justus et al. 2024). A bTB é considerada uma doença de difícil erradicação em animais domesticados se houver animais selvagens atuando como reservatórios (Palmer, 2013). Alguns países apresentam baixas taxas de propagação da bTB, porém muitas vezes a erradicação da bTB é difícil de ser alcançada pela reintrodução da bTB pelos reservatórios selvagens (Bezoz et al., 2023). Foi observado que a incidência de bTB é maior em fêmeas do que em machos; a raça do bovino também interfere nas taxas de infecção por *M. bovis*, bem como idade e estado nutricional (Broughan et al., 2016). Estudos revelaram que diferentes raças europeias, como as raças *Holstein* e *Jersey* e cruzamentos destas, tiveram maior incidência de bTB em comparação com raças africanas, como o zebu (Konch et al., 2017; Das et al., 2018). Outros fatores que interferem na transmissão da bTB são o tamanho do rebanho, o tipo de rebanho; histórico de bTB e reservatórios de vida selvagem (Taylor et al., 2003).

Nos EUA, Irlanda, Inglaterra e Nova Zelândia, a implementação de programas de controle reduziram a taxa de incidência da bTB em rebanhos bovinos. No entanto, relatos de reintrodução do bacilo em rebanhos bovinos por animais selvagens, como veados (*Odocoileus virginianus*) nos EUA, texugos (*Meles meles*) na Irlanda e Inglaterra, marsupiais selvagens (*Trichosurus vulpecula*) e furões (*Mustela furo*) na Nova Zelândia, entre outros animais que servem como reservatórios para *M. bovis*, são comuns (Corner et al., 2006; Byrne et al., 2014; More et al., 2015). Justus et al. (2024) sugerem que, apesar dos dados limitados, texugos, javalis e raposas vermelhas parecem ser espécies selvagens preocupantes para a transmissão de bTB na Europa, com alto risco de infecção por *M. bovis*. Em países como Brasil e Índia, a bTB permanece endêmica. Mol et al. (2016) relatam no Brasil a infecção por *M. bovis* em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), reforçando o papel dos animais selvagens na propagação e reintrodução da bTB.

Fig1.1 Vias de transmissão do *Mycobacterium bovis*.

(Fonte: Adaptado de Gonzalo-Asensio et al., 2017)

Legenda: A imagem ilustra os diferentes tipos de transmissão do *Mycobacterium bovis*. Ela pode ocorrer entre bovinos (transmissão direta), bovinos para humanos (contato ou consumo de produtos contaminados) bovinos para animais selvagens (interação entre espécies). Humanos infectados podem reintroduzir o bacilo no rebanho de bovinos (zoonose reversa) assim como os animais silvestres, que são considerados importantes reservatórios do *M. bovis*.

1.5 Coinfecção entre *Mycobacterium bovis* e vírus da leucose bovina (BLV)

Infecções representam situações que comprometem o equilíbrio imunológico do hospedeiro, onde uma desregulação intrínseca do sistema imunológico é causada por um fator externo (Soldevilla et al., 2023). Estudos atuais têm demonstrado que infecções virais afetam aspectos imunológicos, patológicos e de tratamento de infecções micobacterianas (Diedrich & Flynn, 2011; Nusbaum et al., 2016). O estabelecimento e a progressão da bTB são influenciados pela sobrevivência do *M. bovis* no ambiente intracelular e pela capacidade do hospedeiro de controlar o crescimento bacteriano (Gutierrez et al., 2004). As coinfeções

podem comprometer os mecanismos de defesa do hospedeiro, aumentando a suscetibilidade à bTB (Hughes et al., 2005; Claridge et al., 2012). Coinfecções também podem interferir nas respostas aos testes diagnósticos, como as causadas por helmintos (Claridge et al., 2012). O SICTT, que é o principal método de diagnóstico para bTB (Borham et al., 2022) e ensaios de liberação de IFN- γ (IGRA) e ELISA, usados como estratégia diagnóstica em alguns países (Waters et al., 2011; Moens et al., 2023) tem sua sensibilidade e especificidade influenciadas pela progressão da doença e imunomodulação de coinfecções (de la Rua-Domenech et al., 2006). Assim, uma vez que as respostas de hipersensibilidade tardia (DTH) sustentam diagnósticos baseados em testes cutâneos, como o SICTT e ensaios IGRA, uma resposta suprimida em animais infectados com o vírus da leucose bovina (BLV) pode resultar em diagnósticos falso-negativos, impactando nos programas de controle da bTB (De La Rua-Domenech et al., 2006). Alguns estudos mostraram que a coinfecção *Fasciola hepatica*/*M. bovis* pode reduzir a sensibilidade do SICTT (Flynn et al., 2007; Claridge et al., 2012). Da mesma forma, a infecção persistente por diarreia viral bovina (BVD) suprime as respostas de IFN- γ e a proliferação de linfócitos (Charleston et al., 2001). Em bovinos infectados com BLV, o aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) e a sinalização do receptor de IL-2 podem alterar a função das células B e T (Stone et al., 2000; Hughes et al., 2005), potencialmente interferindo nos ensaios de diagnóstico de bTB. Essas alterações imunológicas poderiam explicar parcialmente a persistência da bTB nos rebanhos e falhas nos programas de erradicação.

Alguns estudos também sugeriram que a infecção por BLV aumenta a suscetibilidade a outras doenças infecciosas, como mastite, infecções de pele e doenças dos cascos (Emanuelson et al., 1992; Trainin et al., 1996; Frie, 2015). A coinfecção entre *M. bovis* e parasitas helmínticos e/ou BVD demonstrou influenciar a capacidade de controle do *M. bovis* (Ezenwa et al., 2010; Kao et al., 2007). Achados semelhantes foram relatados em outros modelos de coinfecção, como vírus influenza/*M. tuberculosis* (Walaza et al., 2019) e SARS-CoV-2/*M. tuberculosis* (Pathak et al., 2021; Hildebrand et al., 2022), onde as coinfecções virais exacerbaram a gravidade da doença bacteriana. Em humanos, demonstrou-se que doenças infecciosas apresentam maior gravidade clínica devido à presença de superinfecções, como o vírus Influenza A (IAV), em que coinfecções estafilocócicas ou estreptocócicas intensificam a gravidade e a taxa de mortalidade (Walch & Broz, 2024).

A hipótese de que há interação entre BLV e bTB baseia-se na relação com a

etiopatogenia e em dois fatores que podem atuar de forma interligada: o manejo sanitário aplicado aos rebanhos e as particularidades imunológicas do BLV (Mendes et al., 2011). Seu impacto na patogênese da bTB permanece pouco caracterizado, embora tenha implicações importantes para o desenvolvimento de vacinas, pois as respostas de anticorpos protetores são cruciais para uma imunização eficaz contra *M. bovis* (Qu et al., 2023).

1.6 Etiologia da leucose enzoótica bovina (LEB)

O Vírus da leucose viral bovina (BLV) é um retrovírus oncogênico linfotrópico B que pertence ao gênero *Deltavirus* e infecta principalmente o gado leiteiro, causando a leucose bovina enzoótica (LEB) (Aida et al., 2013; Nikbakht Brujeni et al., 2016). Sabe-se que o BLV afeta o sistema imunológico de animais infectados, resultando em vários graus de imunossupressão (Lv et al., 2024). Semelhante a outros retrovírus, o BLV integra-se ao genoma do hospedeiro como um pró-vírus e causa infecções ao longo da vida. Em aproximadamente 70% das infecções causadas pelo BLV os bovinos não apresentam sintomas (Kuczewski et al., 2019). Entretanto, um a cada três bovinos infectados desenvolve linfocitose persistente, caracterizada pela expansão policlonal não maligna de linfócitos B CD5⁺ e 5-10% dos bovinos infectados desenvolve linfossarcoma monoclonal maligno de células B após um longo período de latência (4-10 anos) (Gillet et al., 2007). Os bovinos infectados podem apresentar redução na produção de leite, anormalidades digestivas, perda de apetite, perda de peso e fraqueza geral, além de diferentes sintomas neurológicos (Polat et al., 2017).

O BLV interrompe a homeostase imunológica infectando linfócitos B e T e inibindo a apoptose por meio da regulação positiva de BCL-2 (Glazko & Kosovsky, 2013), mas também pode infectar monócitos, neutrófilos e granulócitos (Polat et al., 2017). A capacidade do vírus em suprimir uma resposta imune e sua patogenicidade estão principalmente ligadas ao complexo gp51/gp30, codificado pelo gene Env (Glazko & Kosovsky, 2013; Lavanya et al., 2008; Tomé-Poderti et al., 2024) e ao local de inserção do provírus no genoma do hospedeiro. A entrada viral ocorre de maneira sequencial pela ligação ao receptor (via gp51) (Lavanya et al., 2008) e fusão da membrana (mediada por gp30) (Vonèche et al., 1992). Interações com o receptor cognato (Bai et al., 2019) desencadeiam uma mudança conformacional no complexo gp51/gp30 que culmina no processo de fusão entre a membrana viral e celular (Wallin et al., 2005). Gp51 é a subunidade mais imunogênica de Env, e induz a expressão de uma grande quantidade de anticorpos específicos em bovinos infectados (Troiano et al., 2013). Devido à

pequena variação na sequência do BLV entre hospedeiros e à possibilidade de uma grande variedade de clones dentro de um mesmo animal infectado, assumiu-se que o sítio de incorporação do provírus é o principal atributo que diferencia uma célula infectada da outra, sendo um fator crucial para a transformação maligna (Rosewick et al., 2017).

1.7 Histórico e prevalência da leucose enzoótica bovina

Anteriormente, na Europa do século XIX a LEB era denominada de Linfossarcoma Enzoótico Bovino, e já era conhecida como uma doença infectocontagiosa e de rápida disseminação pelos rebanhos. Posteriormente, no ano de 1917, o agente causal (BLV) foi identificado (Axel, 2017). A introdução do BLV no Brasil ocorreu através da importação de bovinos infectados vindos da Europa e América do Norte (Pinheiro et al., 2013).

O BLV infecta bovinos em todo mundo, com exceção de alguns países da Europa e Oceania (EFSA, 2015), tendo grande impacto na indústria pecuária (Nakada et al., 2023). Porém, não existem tratamentos eficazes ou vacinas disponíveis comercialmente (Gillet et al., 2007). Assim, a segregação e/ou o abate de bovinos infectados e a prevenção de novos casos de infecção são consideradas as estratégias mais eficazes contra o BLV (EFSA, 2017). No Japão a prevalência de bovinos BLV positivos (BLV+) varia entre 28,0 a 40,9% (Murakami et al., 2013), e 31,0 a 41,9% na China (Yu et al., 2019). Endêmico nos rebanhos bovinos dos EUA, estima-se que o BLV infecte aproximadamente 40% do gado leiteiro dos EUA (Ruggiero et al., 2019) e no Canadá 88,4% dos rebanhos leiteiros são BLV+ (John et al., 2020).

A prevalência de LEB na América do Sul varia de 23 a 84%, sendo que no Brasil as estimativas variam entre 17 e 60% (Marawan, 2021). De acordo com diferentes estudos, todas regiões brasileiras apresentaram infecção de bovinos pelo BLV (Fernandes et al., 2021; Ramalho et al., 2021), evidenciando-se a circulação dos genótipos 1, 2, 5 e 6 na região Sudeste do país (Gregory et al., 2017). Nos estados da região Sul, Centro-Oeste e Nordeste as taxas sorológicas de infecção variam entre 11,78 e 45% (Heidman et al., 2015; Baptista-Filho et al., 2019; Rodakiewicz et al., 2018). Por outro lado, estudos utilizando diagnóstico molecular de bovinos BLV+ obtiveram 4,8% de bovinos reagentes no Estado de São Paulo (D'Angelino et al., 2013), enquanto no Estado de Santa Catarina Rodakiewicz et al. (2018) obtiveram taxa de 80,5% para bovinos BLV positivos.

A ausência de uma política sanitária pública específica para o controle e/ou erradicação da doença (Brasil, 2013) e o desconhecimento da LEB por grande parte dos produtores contribui

para o aumento da disseminação da doença no rebanho brasileiro (Pereira et al., 2023).

1.8 Transmissão do BLV

O BLV infecta naturalmente bovinos, tendo sido relatada sua transmissão experimental em ovelhas, cabras e alpacas (EFSA, 2015; Ruiz et al., 2018). A transmissão do BLV pode ser vertical ou horizontal (Kobayashi et al., 2015). A transmissão horizontal por meio da transferência de linfócitos sanguíneos infectados é a principal via de infecção do BLV (Gillet et al., 2013) e ocorre através da exposição direta com fluidos biológicos de bovinos infectados durante tarefas rotineiras de manejo, como marcação de orelhas, descorna, palpação transretal, imunizações, cirurgias, transfusões ou ao reutilizar agulhas e luvas contaminadas com vírus. Inseminação artificial, transferência de embriões e picadas de insetos também podem atuar como fontes de transmissão do BLV (Marawan et al., 2021). A transmissão vertical ou transplacentária também é relatada (Mekata et al., 2015), sendo a carga proviral (PLV) da mãe um importante fator na transmissão para seu bezerro. Estudos demonstraram valores de infecção de 14/29 e 4/4 bezerros infectados nos grupos de PLV versus 9/95 e 0/2 bezerros infectados nos grupos de baixa PLV (Mekata et al., 2015). Ademais os efeitos das PLVs na taxa de transmissão podem elucidar informações inconclusivas sobre a transmissão vertical do BLV (Hopkins & Digiaco, 1997). A falta de controle sanitário e inclusão de bovinos não testados no rebanho, assim como o manejo inadequado das ordenhas, também representam fatores de risco para transmissão do BLV (Zhao et al., 2025).

1.9 Diagnóstico da leucose enzoótica bovina (LEB)

O diagnóstico da leucose enzoótica bovina (LEB) baseia-se em dados epidemiológicos — como a distribuição da doença na população, a frequência de casos e o histórico de exposição dos animais — e é realizado quando há suspeita clínica (Jimenez & Valle, 2013). Diferentes métodos podem ser utilizados, porém geralmente a infecção pelo BLV em bovinos é identificada utilizando métodos sorológicos, como o ELISA ou métodos de detecção do DNA proviral como a PCR (Polat et al., 2017).

O ELISA é muito usado na detecção anticorpos anti-BLV devido suas vantagens como elevada sensibilidade e fácil realização. Porém, bovinos com baixos títulos de anticorpos podem não ser detectados. Ademais, em bovinos reativos, o grau de progressão da doença não é

fornecido (Jimba et al., 2012). Em contraste, a PCR detecta o genoma proviral do BLV integrado ao genoma do hospedeiro, mesmo na ausência de anticorpos (Tajima et al., 1998).

Diferentes estudos demonstraram que as PVLs estão relacionadas à progressão da doença (Somura et al., 2014; Kobayashi et al., 2019) e ao risco de transmissão (Sato et al., 2022; Borjigin et al., 2023), sugerindo a importância da PVL como marcador diagnóstico. Portanto é bem documentado a relação entre PVL alta e aumento das taxas de desenvolvimento da LEB (Jimba et al., 2010; Ohno et al., 2015; Le et al., 2020) e disseminação do BLV (Watanuki et al., 2019; Kohara et al., 2023), tornando métodos de quantificação de PVLs importantes para o controle e erradicação do BLV (Watanuki et al., 2024).

1.10 Coinfecção entre bTB/BLV e resposta DTH

O SICTT, principal teste diagnóstico da bTB, baseia-se na resposta de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH) à aplicação do derivado proteico purificado (PPD). Como as respostas DTH sustentam diagnósticos como o SICTT e o IGRA fatores que comprometam a intensidade e atividade da resposta imune celular efetora podem impactar resultados dos testes diagnósticos dependentes de IFN- γ . Trabalhos anteriores demonstram que a coinfecção pela *Fasciola hepática*/*M. bovis* afeta o equilíbrio entre a resposta Th1/Th2, mantendo os níveis de IL-4 altos (citocina anti-inflamatória) (Flynn et al., 2007; Claridge et al., 2012), comprometendo a sensibilidade de testes diagnósticos. De forma semelhante, Charleston et al. (2001) demonstraram que a infecção persistente pelo BVD suprime fortemente a resposta proliferativa de linfócitos e a produção IFN- γ nas fases iniciais da infecção. Kelly et al. (2022) relatam que a coinfecção com agentes imunossupressores como o BLV pode favorecer a ocorrência de resultados falso-negativos e contribuir para a anergia. Isso ocorre porque a infecção pelo BLV aumenta a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade tipo II (MHC II) e receptores para IL-2 (IL-2R), afetando a resposta dos linfócitos B e T (Stone et al., 1995; Stone et al., 2000; Hughes et al., 2005). Estes dados demonstram a importância das coinfeções para a resposta antimicobacteriana e capacidade preditiva dos testes diagnósticos (Claridge, et al., 2012). Benavides & Monti (2024) também relataram maior infectividade em vacas BLV com linfocitose persistente (LP+), resultados que estão associados a um maior número de linfócitos B circulantes (Beyer et al., 2002). Adicionalmente, Erskine et al. (2011) demonstraram que bovinos bTB/BLV apresentam células mononucleares do sangue periférico com menor proporção de linfócitos T e maior proporção de células B quando comparados com animais BLV negativos (BLV-), com menor impacto

sobre a resposta imune adaptativa humoral. Sob estas circunstâncias é possível que animais infectados pelo *M. bovis*, sob as condições de coinfeção pelo BLV apresentem resultado negativo ou inconclusivo no SICTT e/ou ELISA, diminuindo as chances dos casos de bTB serem diagnosticados. São escassos estudos que avaliam a interferência da coinfeção por BLV na sensibilidade de testes baseados na resposta imune celular e humoral para detecção da bTB. Além do SICTT, existem evidências que coinfeções entre *M. bovis* e outros patógenos podem reduzir a sensibilidade de ensaios baseados na quantificação de IFN- γ para diagnóstico de bTB.

1.11 Diagnóstico da tuberculose bovina

A bTB é uma doença de difícil diagnóstico, pois os animais infectados com *M. bovis* muitas vezes não apresentam sinais clínicos até que a infecção já esteja em estágio avançado (Menin, 2013). As limitações dos testes diagnósticos (sensibilidade e especificidade), aliadas ao tamanho do rebanho, estão entre os principais fatores que são relevantes para a persistência da doença. O sucesso dos programas de controle e erradicação de doenças infecciosas está diretamente relacionado à eficiência dos diagnósticos aplicados (Casal et al., 2017). Em geral, o diagnóstico da bTB pode ser realizado por meio de métodos diretos e indiretos. O diagnóstico direto é baseado na identificação do agente etiológico em amostras biológicas, enquanto os métodos indiretos avaliam a resposta imune adaptativa ao *M. bovis*.

1.11.1 Teste de tuberculinização cervical comparativo (SICTT)

O SICTT é o método padrão mais utilizado para diagnóstico da bTB em todo o mundo (Rivière et al., 2014; Bezerra Neto et al., 2024). Este teste *in vivo* é baseado na resposta imune celular por meio da inoculação intradérmica de derivado proteico purificado (PPD) do *M. Bovis/M. Avium* e avaliação da ocorrência de hipersensibilidade tardia (tipo IV), uma característica inflamatória pela formação de edema na pele, causada por vasodilatação local, edema, deposição de fibrina e agregação de células inflamatórias (Radostits et al., 2007), cujo diâmetro deve ser medido 72 horas após a inoculação (Rodrigues et al., 2017).

Derivado proteico purificado é uma mistura complexa de proteínas micobacterianas produzida a partir da cepa AN5 de *M. bovis* (PPD-B) aplicada no SICTT (Sweetline et al., 2019). Alguns dos antígenos apresentados no PPD-B também são encontrados em micobactérias ambientais não patogênicas, tais como os antígenos CFP-10 e ESAT6, podendo ocasionar reatividade cruzada e o aparecimento de falsos positivos (Krasilnikov et al., 2024).

Nestes casos, para mitigar a reatividade cruzada com micobactérias ambientais e aumentar a especificidade do teste, durante o SICTT é aplicado também o PPD aviário (PPD-A) da cepa D4 de *Micobacterium avium* como complemento ao PPD-B (Monaghan et al., 1994; Donnelly et al., 2003). Em animais previamente expostos ao *M. bovis* 72 horas após realização do SICTT, ocorre uma reação de hipersensibilidade tardia no local de aplicação do PPD (Bezerra Neto et al., 2024). Em casos de micobacteriose (infecção por micobactérias do *Complexo Mycobacterium avium* - MAC) a reação de hipersensibilidade tardia também pode ocorrer (Brasil, 2006; Borsuk et al., 2009). Estima-se que a capacidade de detecção do SICTT em bovinos infectados por *M. bovis* varia de 40-80% (Karolemeas et al., 2012). Smith et al. (2021), utilizando o SICTT para detecção de bovinos infectados por *M. bovis*, obtiveram sensibilidade entre 69 e 76% e especificidade entre 86 e 96%.

As principais limitações na utilização do SICTT incluem a complexidade da realização do teste, necessidade de uma segunda visita para avaliação dos resultados, interpretação subjetiva dos resultados, grau de padronização e precisão. Em alguns casos bovinos podem ser positivos no SICTT, mas negativos na cultura. Isso pode ocorrer devido à reatividade cruzada com outras micobactérias, levando a respostas inespecíficas, sendo mais comum em casos de latência e estágios iniciais da doença. As respostas cruzadas levam à sensibilização e impossibilitam a diferenciação entre infecção por MTBC e MAC (Young et al., 2009). A sensibilidade do teste também depende da sensibilização do animal por micobactérias no ambiente, além da origem, dose, pureza, potência do PPD (Ramos et al., 2015) e aspectos genéticos do bovino (Amos et al., 2013).

Nas reações falso-negativas, onde os animais não reagem ao SICTT (anergia), geralmente ocorre em estágios avançados da bTB. A anergia ocorre quando o bovino apresenta evidências da infecção pelo *M. bovis*, mas não há a formação da reação de hipersensibilidade tardia no local da inoculação do PPD. Alguns fatores podem reduzir a reatividade à tuberculina, como coinfeções por agentes imunossupressores como o vírus da leucose bovina (BLV), vírus da diarreia viral bovina (BVD), estresse, desnutrição, fadiga, transporte, infecção avançada ou generalizada e o período periparto (Zhao et al., 2025). A coinfeção por BLV pode favorecer tanto os resultados falsos-negativos quanto contribuir para a anergia, uma vez que a exposição ao vírus da leucose bovina leva à imunossupressão persistente que resulta em respostas reduzidas aos testes diagnósticos e anergia (Kelly et al., 2022).

A baixa sensibilidade do SICTT pode ser melhorada através da remoção de bovinos positivos do rebanho e uso de testes complementares. (Picasso-Risso et al., 2021). Apesar das limitações desse tipo de teste, seu histórico de uso e a ausência de métodos alternativos para

o diagnóstico da bTB fizeram do SICTT uma ferramenta epidemiológica e diagnóstica popular para o manejo da bTB (Carneiro et al., 2021).

1.11.2 Diagnóstico histopatológico

O diagnóstico histopatológico pode ser utilizado para complementar o sistema de vigilância de casos de lesões *post-mortem* sugestivas da bTB (Mckinley et al., 2018) e a categorização de lesões em animais reativos e não reativos (Larenas-Muñoz et al., 2022). Além das lesões sugestivas a confirmação da infecção deve ser realizada através da detecção de bacilos álcool-acidos-resistentes (BAAR) nos cortes histológicos através da coloração de Ziehl-Neelsen (Campelo et al., 2021). As técnicas de coloração para identificação de MTBC são baseadas nas características únicas das micobactérias, conferidas pela estrutura complexa da parede celular lipídica, que as tornam resistentes à descoloração por misturas de álcool-ácido (Kia et al., 2023). A presença de lesões histopatológicas características da bTB contribuem para o diagnóstico presuntivo da doença. Bovinos infectados apresentam, entre outras características, lesões com necrose caseosa (Dametto et al., 2020), com ou sem mineralização distrófica central, recrutamento de células características da resposta granulomatosa como células epitelioides, células gigantes multinucleadas, macrófagos e linfócitos com deposição de tecido conjuntivo delimitando a lesão (Cronan, 2022). Apesar da alta sensibilidade à detecção de micobactérias por microscopia, apresenta baixa especificidade (Sattar et al., 2021). Micobactérias não tuberculosas, *Actinomycetales* e bactérias do gênero *Nocardia* causam lesões semelhantes à tuberculose (Nuru et al., 2017; Michelet et al., 2018). Além disso, é necessária uma alta carga bacteriana para identificação por microscopia, o que torna necessária a utilização de métodos diagnósticos complementares para chegar ao diagnóstico final, como isolamento bacteriano e técnicas de PCR (Borham et al., 2022).

Na Espanha, entre 8 e 9% dos casos de bTB são detectados no matadouro (Bezós et al., 2023). No entanto, Pozo et al. (2021) mostram que a chance de identificar bovinos com lesões de bTB varia significativamente dependendo do matadouro onde o animal é abatido. Para bovinos de criadores, essa detecção varia de 603 a 3.070 casos por 10.000 animais, enquanto para bovinos de não criadores varia de 0,2 a 16,1 casos por 10.000 animais.

1.11.3 Isolamento bacteriano

O isolamento bacteriano é atualmente considerado o teste padrão-ouro para detecção do *M. bovis*, mas apresenta limitações significativas em termos de tempo e sensibilidade (Yatbantoong & Rukkwamsuk, 2017). Estima-se que os resultados desse diagnóstico levem até três meses para serem concluídos devido à lenta taxa de crescimento das micobactérias (Oie, 2018; Soares-Filho et al., 2019). Em condições adequadas de meio ideal, temperatura e uso de descontaminantes, surgem colônias bacterianas com aparência rugosa e coloração esbranquiçada. Após o crescimento em meio sólido, as colônias devem ser submetidas a colorações especiais de Ziehl-Neelsen, testes bioquímicos e moleculares para diferenciar as micobactérias entre os membros do MTBC (Mohamed et al., 2011). Em meios contendo glicerol, o crescimento de *M. bovis* é prejudicado, condição conhecida como crescimento disgênico; porém, em meios com piruvato sem glicerol, apresentam bom crescimento (Claro-Almea et al., 2020).

Os padrões de crescimento característicos e a morfologia colonial fornecem um diagnóstico presuntivo de *M. bovis*; no entanto, todos os isolados precisam ser confirmados usando metodologias adicionais (Oie, 2018). Além do tempo de crescimento, o isolamento bacteriano tem outros fatores limitantes, como ser trabalhoso, arriscado e apresentar alto nível de contaminação em amostras de tecido, com redução de bactérias viáveis (Issa et al., 2017; Soares-Filho et al., 2019). Devido à necessidade de descontaminação por compostos tóxicos, a viabilidade das micobactérias é frequentemente comprometida, afetando o resultado do teste. Atualmente, o método de descontaminação mais utilizado para o isolamento de *M. bovis* em tecidos bovinos é o método *Petroff*, no qual uma solução de NaOH a 4% é usada como descontaminante (Oie, 2018). A baixa sensibilidade ao isolamento bacteriano impede sua recomendação como teste complementar de rotina (Albernaz, et al., 2015), o que se deve principalmente ao confinamento de micobactérias em lesões *post-mortem*.

1.11.4 Diagnóstico Molecular

O sequenciamento do genoma completo de *M. tuberculosis* (Cole et al., 1998) e *M. bovis* (Garnier et al., 2003) permitiu a realização de diferentes análises comparativas, demonstrando que *M. bovis* e *M. tuberculosis* apresentam mais de 99% de homologia genômica e têm sequências de rRNA 16S idênticas (de la Rua-Domenech et al., 2006). Recentemente, uma variedade de métodos baseados em Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram desenvolvidos para o diagnóstico da bTB (Michelet et al., 2018; Elsohaby et al., 2020), de

modo que o diagnóstico molecular adquiriu grande importância no controle da tuberculose e outras doenças infecciosas (Acharya et al., 2020). A PCR é útil na detecção direta de *M. bovis* em tecidos bovinos e é capaz de diferenciar membros do MTBC (Santos et al., 2020), além de ser importante para diferenciação de genes e regiões de resistência (Désire et al., 2015).

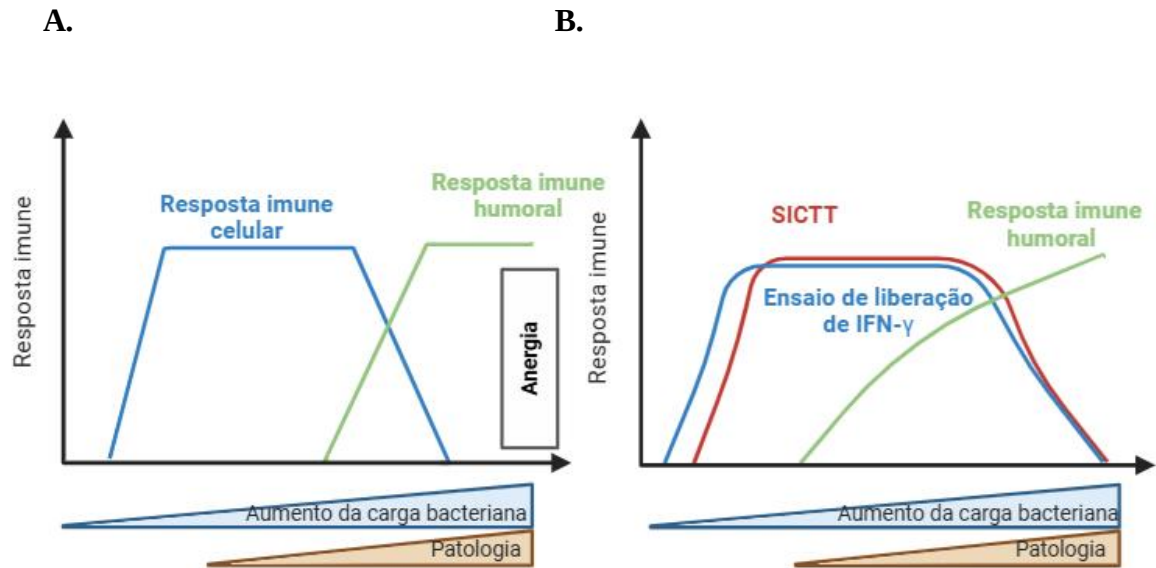
Apesar do diagnóstico molecular permitir a detecção rápida de patógenos de crescimento lento como micobactérias (Deggim-Messmer et al., 2016), tem apresentado resultados variáveis, com sensibilidade variando de 50–80% dependendo do estudo e métodos utilizados (Rakotosamimanana et al., 2017). Nos casos em que as lesões de bTB não são observadas (fase inicial da infecção) a sensibilidade da PCR para a detecção de bovinos infectados é ínfima (Norby et al., 2004). Entretanto, em animais SICTT positivos pode atingir 50% (Taylor et al., 2007). Essas variações na sensibilidade são causadas principalmente por diferenças na técnica de remoção de DNA das lesões, que não apresentam consenso sobre o melhor método de remoção (Yoshikawa et al., 2011). Outros fatores para a ocorrência de variação são a contaminação da amostra, baixa concentração de DNA, presença de micobactérias ambientais (Ikuta et al., 2016; Soares Filho et al., 2019) e ausência de protocolos bem definidos para o pré-tratamento das amostras (Prajwal et al., 2023).

1.11.5 Ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA)

O ensaio de liberação de IFN- γ é o principal teste auxiliar no diagnóstico da bTB e se baseia na dosagem da citocina IFN- γ após estimulação com PPD-B e PPD-A (Alito et al., 2003). Para isso, o IFN- γ produzido pelas células T é detectado por anticorpos monoclonais anti-IFN- γ ; a não detecção de citocina no ensaio significa que o animal não é reativo para bTB (Matteis et al., 2023).

Dentre as vantagens dos testes baseados nos níveis de IFN- γ (Figura 2) está a alta sensibilidade e rapidez, além da realização do teste em ambiente laboratorial, sem necessidade de retorno à propriedade quando comparado ao SICTT (Algammal et al., 2019). O IGRA não interfere no estado imunológico do animal, permitindo sua reprodução em curto espaço de tempo (Ghielmetti et al., 2021). Outras vantagens sobre o SICTT são o direcionamento na interpretação dos resultados, menor interferência dos fatores externos, capacidade de detectar animais não reativos no SICTT e precocidade. A detecção de IFN- γ pode ser realizada a partir de 14 dias após a infecção, enquanto no SICTT a detecção só pode ser realizada entre 3-6 semanas após a infecção (Bezoz et al., 2014).

Fig. 1.2 Detecção da resposta imune na infecção por *Mycobacterium bovis*.



(Fonte: Adaptado de Pollock & Neill, 2002).

Legenda: **(A) Dinâmica da resposta imune na infecção por *M. bovis*:** A infecção inicial é marcada pela predominância da resposta imune celular Th1, mediada pela liberação de IFN- γ . Com a progressão da doença, ocorre transição para a resposta Th2 (humoral), com aumento na produção de anticorpos, o que resulta em anergia ao teste de tuberculinização cervical comparativo (SICTT) em muitos animais. **(B) Detecção da resposta imune celular pelo IGRA:** O ensaio de liberação de IFN- γ depende da resposta Th1 e apresenta limitações quando predomina a resposta Th2, de modo semelhante ao SICTT. Nessas situações, testes baseados na resposta humoral, como ELISA, podem ser utilizados para identificar animais anérgicos.

Por outro lado, o ensaio de IFN- γ apresenta custos e desafios semelhantes aos do SICTT, uma vez que ambos dependem da resposta imune celular. Em estudo com 922 animais na Irlanda do Norte, McCallan et al. (2021) observaram que apenas 365 (40%) dos positivos ao SICTT também foram detectados pelo IFN- γ . Além disso, o ensaio requer elevada demanda logística, pois o procedimento deve ser iniciado em até 24 horas após a coleta do sangue (de la Rua-Domenech et al., 2006; Vordermier et al., 2008; Schiller et al., 2010; Ramos et al., 2015). Outro fator que influencia o desempenho do IGRA é a variação na sensibilidade e especificidade observada entre diferentes protocolos, que utilizam distintos antígenos, tempos variados entre coleta e estímulo da amostra, assim como diferentes coortes e populações de bovinos (Schiller et al., 2010; De Lisle et al., 2017).

1.11.6 Proteínas imunogênicas utilizados no desenvolvimento de testes de ELISA para detecção de anticorpos anti-*M. bovis*

Testes sorológicos rápidos baseados na detecção de imunoglobulinas (IgM/IgG) foram amplamente utilizados no diagnóstico de infecções, tanto em humanos quanto em animais, com resultados de sensibilidade e especificidade superiores aos testes baseados na resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (tipo IV) (Casal et al., 2017). Apesar da predominância inicial da resposta imune celular Th1, que direciona e mantém uma resposta com altos níveis de IFN- γ , sabe-se que com o avanço da doença ocorre aumento da imunidade humoral e a resposta imune muda para o tipo Th2, com aumento dos anticorpos circulantes, permitindo que testes imunoenzimáticos sejam aplicados para detecção de anticorpos micobacterianos em soro/plasma/leite (Pollock & Nail, 2002). Autores relatam a detecção precoce de anticorpos IgM e IgG contra *M. bovis* no soro e no leite de bovinos infectados, que podem ser detectados 18-31 dias após a infecção (Lyashchenko et al., 2017).

Testes sorológicos baseados na detecção de resposta imune humoral podem ser estrategicamente úteis na detecção de animais falso-negativos (anérgicos), onde há infecção avançada e generalizada, levando à falha na resposta ao SICCT devido a resposta imune celular prejudicada (Moens et al., 2023). Eles também complementam os testes baseados na imunidade celular, sendo úteis para diagnóstico onde pode há uma resposta imune do tipo Th2 (McCallan et al., 2021). Apresentam também vantagens como alta especificidade, alto rendimento, facilidade de coleta da amostra, curto tempo de execução e baixo custo (Schiller et al., 2010; Soares Filho et al., 2020; McCallan et al., 2021; Ortega et al., 2021), entretanto, sua sensibilidade pode ser reduzida devido a uma baixa resposta imune humoral ou inconsistência ao longo da doença (Sakamoto et. al., 2018).

Vários fatores podem interferir na sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos durante o diagnóstico da bTB, incluindo o tipo de antígeno usado, estado imunológico do animal, estágio da infecção, exposição prévia ao PPD e localização geográfica (Borham et al., 2022). Sabe-se que a aplicação do PPD estimula a produção de anticorpos em bovinos bTB positivos, o que aumenta significativamente a sensibilidade dos testes diagnósticos baseados na resposta imune humoral (Li et al., 2022). Dessa forma, o reforço causado pela aplicação do PPD pode aumentar a sensibilidade do sorodiagnóstico da bTB e contribuir para o avanço de programas que visem sua erradicação (Waters et al., 2015; Soares Filho et al., 2020). Diferentes estudos avaliaram testes ELISA para complementar o SICCT. Casal et al. (2014)

avaliaram o efeito do SICTT nos níveis de anticorpos no sangue periférico de bovinos positivos para bTB 3 e 15 dias após a realização do SICTT e observaram que a sensibilidade do ELISA aumentou de 24 para 70% 15 dias após realização do teste. Souza et al. (2019) utilizaram o antígeno quimérico recombinante MPB83/MPB70/ESAT-6 para sensibilizar placas de ELISA e obtiveram sensibilidade de 79,5% e especificidade de 75,5% em soros colhidos 7 dias após a aplicação do PPD. Fontana et al. (2018) avaliaram um ELISA composto por cinco antígenos em soros colhidos 15–20 dias após o SICTT e obtiveram sensibilidade de 74,2% e especificidade de 94,9%, enquanto Griffa et al. (2020) validaram um ELISA utilizando uma mistura de antígenos da cepa AN5 em soros 15–17 dias após SICTT negativo e detectaram a infecção em 83,7% das amostras.

Atualmente, o sequenciamento gênico é a principal ferramenta de desenvolvimento de novos testes diagnósticos para detecção de bTB (Zeineldin et al., 2023). As regiões gênicas utilizadas nos testes expressam antígenos de *M. bovis* que levam à formação de respostas imunes específicas. Até o momento, foram identificadas 16 regiões de diferença definidas como sequências de nucleotídeos presentes no genoma de *M. bovis*, mas ausentes em *M. tuberculosis* (Sierra et al., 2023). Somente na região de diferença 1 (RD1) são codificados os antígenos Target 6-kDa (ESAT-6) (Aagaard, et al., 2009) e Culture Filtrate Protein 10-kDa (CFP-10) (Kagina et al., 2010), que têm como principal característica a imunodominância (Wellington et al., 2021).

A imunodominância compreende uma resposta imune altamente específica e robusta de células T, que ocorre durante uma infecção aguda, e é desencadeada por um grupo de epítomos (Wellington et al., 2021). Esses antígenos estão presentes em micobactérias patogênicas como *M. bovis* e *M. tuberculosis* (Comas et al., 2010) e são secretados em grande quantidade durante a infecção em hospedeiros ou em cultura *in vitro*, podendo ser utilizados isoladamente ou de forma recombinante através de uma molécula híbrida para modelos de diagnóstico (Dosanjh et al., 2008). Além de possuírem a capacidade de ativar células T logo no início da infecção pelo *M. bovis*, são importantes para o crescimento e sobrevivência da micobactéria no interior das células. Estudos com mutações nos genes que expressam esses antígenos não induziram respostas específicas de células T e suprimiram a virulência micobacteriana (Champion et al., 2009).

Os antígenos MBP70, MPB83, ESAT6 e CFP10 tem sido os principais alvos de estudos com testes sorológicos por induzirem uma marcante resposta imune humoral em bovinos infectados com *M. bovis* (Waters et al., 2011; O'brien et al., 2023). As respostas contra os antígenos MPB70 e MPB83 atingem o pico duas semanas após a aplicação do SICTT e

começam a diminuir entre um e dois meses (Waters et al., 2015). Em decorrência disso, Waters et al. (2011) desenvolveram o IDEXX *M. bovis* Ab test, um *kit* comercial que utiliza os antígenos MPB70/MPB83 para a detecção de bTB em bovinos. Moens et al. (2023) compararam a capacidade de detecção do IDEXX *M. bovis* Ab Test e do Enferplex Bovine TB de 11 antígenos (11Ag), observando que o Enferplex apresentou sensibilidade significativamente superior à do IDEXX, especialmente em animais positivos ao SICCT. Ensaio baseado na mesma tecnologia já haviam sido descritos anteriormente, porém utilizando diferentes combinações e números de antígenos (Casal et al., 2014; Whelan et al., 2010). De forma semelhante, McCallan et al. (2021) avaliaram o desempenho de distintos testes sorológicos, incluindo o IDEXX, o Enferplex 2Ag (CFP-10 e ESAT-6) e o Enferplex 4Ag (MPB70, MPB83, CFP-10 e ESAT-6). Nesse estudo, os testes sorológicos apresentaram baixa frequência de bovinos reagentes: no IDEXX, 30 de 921 animais (3,26%) foram positivos; no Enferplex 2Ag, 13 de 921 (1,41%) apresentaram reatividade; enquanto no Enferplex 4Ag, foram observados 78 resultados positivos em 284 animais (27,46%). Recentemente, Moens et al. (2023) desenvolveram o Luminex-bTB, com múltiplos antígenos, incluindo recém-identificados (MPB70, MPB83, MPB70/83, ESAT6/CFP10, PE25/PPE41, Mb1403 e Mb0592) e compararam com ELISA de quatro antígenos usuais (MPB70/MPB83 e ESAT6/CFP10). Os resultados apresentaram melhor desempenho para Luminex-bTB com valores de especificidade e sensibilidade de 97,6% e 42,8%, respectivamente.

Nogueira et al., (2010) também identificaram um antígeno altamente antigênico, a lectina de 13 kDa secretada pelo *M. tuberculosis* (SMTL-13), produto do gene Rv1419 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/eji.200939747>. Através de análise de bancos de dados foi verificado que a proteína SMTL-13 apresenta 100% de identidade com a proteína Mb1454 expressa pelo gene Mb1454 de *M. bovis* (<https://mycobrowser.epfl.ch/genes/Mb1454>). A proteína hipotética Mb1454 de *M. bovis* possui relação estrutural com lectinas da família das ricinas, sendo homólogo conservado do Rv1419 de *M. tuberculosis*. O gene apresenta 474 nucleotídeos, codificando uma proteína de 157 aminoácidos que apresenta um peptídeo sinal tipo SEC e uma massa molecular de 16,8 kDa. A proteína madura possui uma massa molecular aparente de 13,6 kDa (Nogueira et al., 2010). Nogueira et al. (2010) ainda relataram que em pacientes com tuberculose ativa esta proteína é capaz de aumentar a produção de citocinas como IFN- γ e imunoglobulinas IgG, participando na indução de respostas imunes celulares e humorais. Por apresentar alta antigenicidade e induzir a produção de anticorpos, a proteína Mb1454 torna-se um promissor alvo para ser utilizado em um teste diagnóstico na detecção de anticorpos anti-*M. bovis* no

soro de bovinos.

Um teste que detecte eficientemente a resposta de anticorpos contra um antígeno pode melhorar significativamente o diagnóstico da bTB (Moens et al., 2023). Porém até o momento nenhum teste foi capaz de detectar bovinos positivos em todos os estágios da infecção (Lyashchenko et al., 1998); e outros estudos revelaram baixa capacidade de detecção em animais infectados com bTB (Casal et al., 2017; McCallan et al., 2021). Assim, o aumento da sensibilidade e da especificidade dos testes para bTB contribuiria automaticamente para a melhoria da saúde animal e pública, reduzindo a transmissão zoonótica (Khalid et al., 2023).

Até o momento, o uso de testes sorológicos para o diagnóstico da bTB é muito limitado, principalmente no Brasil. O IDEXX é único teste ELISA disponível comercialmente para detecção da bTB e apresenta um custo relativamente elevado, por ser produzido nos EUA. Portanto, um teste nacional, de baixo custo, com boa sensibilidade e especificidade e que permita uso em grande escala pode contribuir grandemente para redução de perdas na agropecuária brasileira evitando diagnósticos incorretos que poderiam levar a medidas de controle inadequadas e perdas econômicas devido ao abate de animais falso-positivos (Moyano et al., 2021). Nesse contexto, foi desenvolvido um teste de ELISA para detecção da bTB em soro bovino que pode ser utilizado como teste complementar ao SICTT em estudos epidemiológicos para estimar a real prevalência e monitorar a progressão da doença. Simultaneamente, foi avaliada a interferência da coinfeção entre bTB/BLV na resposta ao SICTT ao *M. bovis*, visto que o Brasil possui uma das maiores incidências de bTB e BLV.

1.12 Hipótese

A proteína recombinante Mb1454 apresenta elevada imunogenicidade e pode ser empregada no desenvolvimento de um teste de ELISA para a detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*, com potencial para discriminar, com alta sensibilidade e especificidade, soros de bovinos naturalmente infectados e não infectados. Espera-se que o teste baseado na Mb1454 apresente desempenho diagnóstico superior aos ensaios comerciais atualmente disponíveis. Considerando o contexto da coinfeção pelo vírus da leucose bovina (BLV), postula-se que essa condição pode interferir na resposta imune protetora do hospedeiro, afetando a evolução da tuberculose bovina e comprometendo a sensibilidade de testes baseados tanto na imunidade celular (como o SICTT) quanto na resposta humoral (como o ELISA).

1.13 Objetivo

1.13.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um teste de ELISA baseado na proteína recombinante Mb1454 para o diagnóstico sorológico da tuberculose bovina em bovinos naturalmente infectados. Além disso, investigar a influência da coinfeção por BLV na resposta imune frente ao *M. bovis* e desempenho dos testes diagnósticos convencionais em bovinos naturalmente infectados.

1.13.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e padronizar um ensaio de ELISA utilizando a Mb1454 como antígeno sensível e específico para detecção de anticorpos anti-*M. bovis* em soros bovinos.
- Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de ELISA-Mb1454 quando comparando com testes comerciais disponíveis.
- Analisar o impacto da coinfeção por BLV na sensibilidade dos testes diagnósticos aplicados à bTB e a outros agentes infecciosos endêmicos.
- Estudar a imunopatologia da bTB durante a coinfeção pelo BLV.

1.14 Referências

AAGAARD, C.; HOANG, T. T. K. T.; IZZO, A.; BILLESKOV, R.; TROUDT, J.; ARNETT, K.; KEYSER, A.; ELVANG, T.; ANDERSEN, P.; DIETRICH, J. Protection and Polyfunctional T Cells Induced by Ag85BTB10.4/IC31H against *Mycobacterium tuberculosis* Is Highly Dependent on the Antigen Dose. **Plos One**, v.4, n.6, p.1-8, 2009.

ACHARYA, B.; ACHARYA, A.; GAUTAM, S.; GHIMIRE, S.P.; MISHRA, G.; PARAJULI, N.; SAPKOTA, B. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Biology Reports**, v.47, n.5, p. 4065-4075, 2020.

AIDA, Y.; MURAKAMI, H.; TAKAGASHI, M.; TAKESHIMA, S.-N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. **Frontiers in Microbiology**, v.4, n.328, 2013.

ALBERNAZ, T.T.; OLIVEIRA, C.M.; LIMA, D.H. DA SILVA E SILVA, N.; CARDOSO, D.P.; LOPES, C.T.; BRITO, MDE, F.; DA SILVA, J.B.; SALVARANI, F.M.; LEITE, R.C.; BARBOSA, J.D. Comparison of the tuberculin test, histopathological examination, and bacterial culture for the diagnosis of tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 6, p.1153-9, 2015.

ALGAMMAL, A.M.; WAHDAN, A.; ELHAIG, M.M. Potential efficiency of conventional and advanced approaches used to detect *Mycobacterium bovis* in cattle. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, p.103574, 2019.

ALITO, A.; MCNAIR, J.; GIRVIN, R. M.; ZUMARRAGA, M.; BIGI, F.; POLLOCK, J. M. CATALDI A. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v. 36, n.11, p.1523-1531, 2003.

ALLEN, A.R.; FORD, T.; SKUCE, R.A. Does *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* Survival in the Environment Confound Bovine Tuberculosis Control and Eradication? A Literature

Review. **Veterinary Medicine International**, v. 8812898, p.1-19, 2021.

ALLEN, A.R.; SKUCE, R.A.; BYRNE, A.W. Bovine Tuberculosis in Britain and Ireland - A Perfect Storm? the Confluence of Potential Ecological and Epidemiological Impediments to Controlling a Chronic Infectious Disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, n.109, 2018.

AMENI, G.; TAFESS, K.; ZEWEDE, A.; EGUALE, T.; TILAHUN, M.; HAILU, T.; SIRAK, A.; SALGUERO, F.J.; BERG, S.; ASEFFA, A.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin reduces the frequency and severity of lesions of bovine tuberculosis under a natural transmission setting in Ethiopia. **Transboundary Emerging Diseases**, v.65, n.1, p.96-104, 2018.

AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ASEFFA, A.; YOUNG, D.B.; HEWINSON, R.G. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.10, p.1533-1538, 2010.

AMOS, W.; BROOKS-POLLOCK, E.; BLACKWELL, R.; DRISCOLL, E.; NELSON-FLOWER, M. CONLAN, A. J. Genetic predisposition to pass the standard SICCT test for bovine tuberculosis in British cattle. **Plos One**, v.8, n.3, e58245, 2013.

ARANDAY-CORTES, E.; BULL, N.C.; VILLARREAL-RAMOS, B.; GOUGH, J.; HICKS, D.; ORTIZ-PELÁEZ, A.; VORDERMEIER, H.M.; SALGUERO, F.J. Upregulation of IL-17A, CXCL9 and CXCL10 in early-stage granulomas induced by *Mycobacterium bovis* in cattle. **Transboundary Emerging and Diseases**, v.60, n.6, p.525-37, 2013.

AVILA, L.N.; GONÇALVES, V.S.P.; PEREZ, A.M. Risk of Introduction of Bovine Tuberculosis (TB) Into TB-Free Herds in Southern Bahia, Brazil, Associated with Movement of Live Cattle. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, n.230, 2018.

AXEL, VILLALOBOS-CORTÉS. Enzootic bovine leukosis and the risk to human health. **African Journal of Biotechnology**, v.16, n.15, p.763–770, 2017.

BAI, X.J.; YANG, Y.R.; LIANG, J.Q.; AN, H.R.; WANG, J.; LING, Y.B.; WANG, Z.Y.; WU, X.Q. Diagnostic performance and problem analysis of commercial tuberculosis antibody detection kits in China. **Military Medical Research**, v.5, n.1, p.10, 2018.

BALDWIN, C.L.; TELFER, J.C. The bovine model for elucidating the role of $\gamma\delta$ T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. **Molecular Immunology**, v.66, n.1, p.35-47, 2015.

BAPAT, P.R.; DODKEY, R.S.; SHEKHAWAT, S.D.; HUSAIN, A.A.; NAYAK, A.R.; KAWLE, A.P. Prevalence of zoonotic tuberculosis and associated risk factors in Central Indian populations. **Journal of Epidemiology and global health**, v. 83, p. 277, 2017.

BAPTISTA- FILHO, L.C.F; SILVA, T.I.B.; FERNANDES, A.C.C.; RAMOS, T.R.R.; MELO, L.E.H. Performance assessment of imported ELISA in the serodiagnosis of the enzootic bovine leukosis in herds of Pernambuco state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.86, e0662018, p.1-4, 2019.

BARLETTA, R. G.; STEFFEN, D. J. *Mycobacterium*. In: McVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 429-442, 2017.

BENAVIDES, B.; MONTI, G. Bovine leukemia virus transmission rates in persistent lymphocytotic infected dairy cows. **Frontiers in Veterinary Science**, p.1-6, 2024.

BEYER, J.; KÖLLNER, B.; TEIFKE, J.; STARICK, E.; BEIER, D.; REIMANN, L.; GRUNWALD, U.; ZILLER, M. Cattle infected with Bovine Leukemia Virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis, but also persistent B-cell lymphopenia. **Journal of Veterinary Medicine**, v.49, n.6, p.270-277, 2002.

BEZERRA NETO, P.S.; MEDEIROS, G.B.; MORAIS, D.A.; LIMEIRA, C.H.; HIGINO,

S.S.S.; ARAÚJO, F.R.; AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J. Prevalence of bovine tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.44, p.e07390, 2024.

BEZOS, J.; CASAL, C.; ROMERO, B.; SCHROEDER, B.; HARDEGGER, R.; RAEBER, A.J.; LÓPEZ, L.; RUEDA, P.; DOMÍNGUEZ, L. Current *ante-mortem* techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p.44-52, 2014.

BEZOS, J.; SÁEZLLORENTE, J. L.; ÁLVAREZ, J.; ROMERO, B.; DÍEZGUERRIER, A.; DOMÍNGUEZ, L.; DE JUAN, L. Bovine tuberculosis in Spain, is it really the final countdown? **Irish Veterinary Journal**, v. 76, n.13, p.1-11, 2023.

BEZZERA NETO, P.S.; MEDEIROS, G.B.; MAIA, R.D.; GAMELEIRA, J.A.L.; SANTOS, D.M.; AZEVEDO, S.S.; HIGINO, S.S.S.; ALVES, C.J. Bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Norte based on secondary data. **Ciência Rural**, v.54, n.10, e20230481, 2024.

BHEMBE, N.L.; JAJA, I.F.; NWODO, U.U.; OKOH, A.I.; GREEN, E. Prevalence of tuberculous lymphadenitis in slaughtered cattle in Eastern Cape, South Africa. **International Journal of Infections Diseases**, v.61, p.27–37, 2017.

BLANCO, F.C.; GRAVISACO, M.J.; BIGI, M.M.; GARCIA, E.A.; MARQUEZ, C.; MCNEIL, M.; JACKSON, M.; BIGI, F. Identifying Bacterial and Host Factors Involved in the Interaction of *Mycobacterium bovis* with the Bovine Innate Immune Cells. **Frontiers in Immunology**, v.12, p.674643, 2021.

BOGGIATTO, P. M.; KANIPE, C. R.; PALMER, M. V. Enhanced Detection of *Mycobacterium bovis*. Specific T Cells in Experimentally-Infected Cattle. **Frontiers in Veterinary Science**, v.14, n.8, 676710, 2021.

BOLAÑOS, C. A. D.; PAULA, C. L.; GUERRA, S. T.; FRANCO, M. M. J.; RIBEIRO, M. G. Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview. **Journal of the Sao Paulo institute of Tropical Medicine**, v. 59, n.40, p.1-13, 2017.

BORHAM, M.; OREIBY, A.; EL-GEDAWY, A.; HEGAZY, Y.; KHALIFA, HO; AL GAABARY, M.; MATSUMOTO, T. A review of bovine tuberculosis: an emerging disease associated with multidrug- resistant mycobacterial species. **Pathogens**, n.11, v.715, p.1-25, 2022.

BORJIGIN, L.; WATANUKI, S.; HAMADA, R.; BAI, L.; HIROSE, T.; SATO, H.; YONEYAMA, S.; YASUI, A.; YASUDA, S.; YAMANAKA, R.; MIMURA, M.; BABA, M.; INOKUMA, M.; FUJITA, K.; SHINOZAKI, Y.; TANAKA, N.; TAKESHIMA, S.N.; AIDA, Y. Effectiveness of integrated bovine leukemia virus eradication strategies utilizing cattle carrying resistant and susceptible major histocompatibility complex class II DRB3 alleles. **Journal of Dairy Science**, v.106, n.12, p.9393-9409, 2023.

BORSUK, S.; NEWCOMBE, J.; MENDUM, T.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; MCFADDEN, J. Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS. **Tuberculosis**, v.89, n.6, p. 423–430, 2009.

BRAHMA, D.; NARANG, D.; CHANDRA, M.; FILIA, G.; SINGH, A.; SINGH, S.T. Diagnosis of Bovine Tuberculosis by Comparative Intradermal Tuberculin Test, Interferon Gamma Assay and esxB (CFP-10) PCR in Blood and Lymph Node Aspirates. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v.9, n.5, p.55–65, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa MAPA nº 50, de 23 de setembro de. **Lista das doenças animais de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial brasileiro**, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 10,

de 3 de março de 2017. Estabelece o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT e a classificação das unidades da Federação de acordo com o grau de risco para as doenças brucelose e tuberculose. Brasília, DF: MAPA, 2017. Diário Oficial da União, n.º 116, Seção 1, p. 4, 20 jun. 2017. Disponível em:

<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSA/PECEBT/IN_SDA_10_2017_PNCEBT.pdf>

BROUGHAN, J.M.; JUDGE, J.; ELY, E.; DELAHAY, R.J.; WILSON, G.; CLIFTON-HADLEY, R.S.; GOODCHILD, A.V.; BISHOP, H.; PARRY, J.E.; DOWS, S.H. A review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland. **Epidemiology and infection**, v.144, n.14, p. 2899–2926, 2016.

BYRNE, A. W.; BARRETT, D.; BRESLIN, P.; FANNING, J.; CASEY, M.; MADDEN, J. M.; LESELLIER, S.; GORMLEY, E. Bovine tuberculosis in youngstock cattle: A narrative review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 1000124, 2022.

BYRNE, A.W.; WHITE, P.W.; MCGRATH, G.; O'KEEFFE, J.; MARTIN, S. W. Risk of tuberculosis cattle herd breakdowns in Ireland: effects of badger culling effort, density and historic large-scale interventions. **Veterinary Research**, v.45, n.109, 2014.

CAMPELO, T.A.; RAFAEL, P.; DE SOUSA, C.; NOGUEIRA, L.D.L.; FROTA, C.C. Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: What has the new millennium brought thus far. **Access Microbiology**, v.3, n.8, 2021.

CAPOFERRI, G.; GHIELMETTI, G.; GLATZ, B.; MUTKE, M.R.; TZANKOV, A.; STEPHAN, R.; KELLER, P.M.; LABHARDT, N.D. Disseminated, fatal reactivation of bovine tuberculosis in a patient treated with adalimumab: a case report and review of the literature. **Infection**, v.53, n.1, p.481-48, 2025.

CARNEIRO, P.A.M.; DE MOURA SOUSA, E.; VIANA, R.B.; MONTEIRO, B.M.; DO SOCORRO L.K.A.; DE SOUZA, D.C.; COELHO, A.S.; FILHO, J.D.R.; JORDAO, R.S.;

TAVARES, M.R.M.; KANEENE, J.B. Study on supplemental test to improve the detection of bovine tuberculosis in individual animals and herds. **BMC Veterinary Research**, v.17, n.1, p.137, 2021.

CARRISOZA-URBINA, J.; MORALES-SALINAS, E.; BEDOLLA-ALVA, M.A.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; GUTIÉRREZ-PABELLO, J.A. Atypical granuloma formation in *Mycobacterium bovis*-infected calves. **PLoS One**, 2019 v.14, n.7, e0218547, 2019.

CASAL, C.; DÍEZ-GUERRIER, A.; ÁLVAREZ, J.; RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; MATEOS, A.; LINSOTT, R.; MARTEL, E.; LAWRENCE, J.C.; WHELAN, C.; CLARKE, J.; O'BRIEN, A.; DOMÍNGUEZ, L.; ARANAZ, A. Strategic Use of Serology for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis after Intradermal Skin Testing. **Veterinary Microbiology**, v.170, n.3–4, p. 342–351, 2014.

CASAL, C.; INFANTES, J. A.; RISALDE, M. A.; DÍEZ-GUERRIER, A.; DOMÍNGUEZ, M.; MORENO, I.; ROMERO, B.; DE JUAN, L.; SÁEZ, J. L.; JUSTE, R.; GORTÁZAR, C.; DOMÍNGUEZ, L.; BEZOS, J. Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.112, p. 214- 221, 2017.

CHAMPION, P. A. D.; CHAMPION, M. M.; MANZANILLO, P.; COX, J. S. Virulence factors secreted by ESX-1 are recognized by multiple cytosolic AAA ATPases in pathogenic mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v.73, n.5, p. 950-962, 2009.

CHARLESTON, B.; HOPE, J.C.; CARR, B.V.; HOWARD, C.J. Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Record**, v.149, n.16, p.481-4, 2001.

CICCHESE, J. M.; EVANS, S.; HULT, C.; JOSLYN, L. R.; WESSLER, T.; MILLAR, J. A.; MARINO, S.; CILFONE, N. A.; MATTILA, J. T.; LINDERMAN, J. J.; KIRSCHNER, D. E. Dynamic balance of pro and anti-inflammatory signals controls disease and limits pathology. **Immunological Reviews**, v. 285, n.1, p.147-167, 2018.

CLARIDGE, J.; DIGGLE, P.; MCCANN, C.M.; MULCAHY, G.; FLYNN, R.; MCNAIR, J.; STRAIN, S.; WELSH, M.; BAYLIS, M.; WILLIAMS, D.J.L. *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. **Nature Communications**, v.22, n.3, p.853, 2012.

CLARO-ALMEA, F.E.; DELGADO-NOGUERA, L.A.; MOTABAN, A.; ESPAÑA, M.; DE WAARD, J.H. A rare case of spinal tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. Is zoonotic tuberculosis underdiagnosed? **IDCases**, v.22, 00982, 2020.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY THIRD, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Deciphering the biology of from the complete genome sequence. *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

COMAS, I.; CHAKRAVARTTI, J.; SMALL, P. M.; GALAGAN, J.; NIEMANN, S.; KREMER, K.; ERNST, J. D.; GAGNEUX, S. Human T cell epitopes of MTB are evolutionarily hyperconserved. **Nature's Genetics**, v.42, n.6, p. 498-503, 2010.

CONSTABLE, P.D.; HINCHCLIFF, K.W.; DONE, S.H.; GRÜNBERG, W. *Veterinary Medicine-e-Book: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*; **Elsevier: Amsterdam**, The Netherlands, 2016.

CORNER, L.A.L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. **Veterinary Microbiology**, v.112, n.2-4, p.303-312, 2006.

CRONAN, M.R. In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses. **Frontiers in Immunology**, v.7, n.13, 820134, 2022.

CUNHA, M.V.; MONTEIRO, M.; CARVALHO, P.; MENDONÇA, P.; ALBUQUERQUE, T.; BOTELHO, A. Multihost tuberculosis: insights from the portuguese control program. **Veterinary Medicine International**, v.2011, 795165, 2011.

D'ANGELINO, R.H.R.; PITUCO, E.M.; VILLALOBOS, E.M.C.; HARAKAVA, R.; GREGORI, F.; DEL FAVA, C. Detection of bovine leukemia virus in brains of cattle with a neurological syndrome: pathological and molecular studies. **Biomed Research International**, 425646, 2013.

DAMETTO, L.L.; SANTOS, E.D.; SANTOS, L.R.; DICKEL, E.L. Bovine tuberculosis: diagnosis in dairy cattle through the association of analyzes. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.40, n.1, 2020.

DAS, R.; CHAKRABARTY, A.; NANDA, P.K.; BANDYOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S. A cross sectional study on prevalence of bovine tuberculosis in Indian and crossbred cattle in Gangetic delta region of West Bengal. **International Journal of One Health**, v.4, n.1, p.1–7, 2018.

DAVIDSON, J. A.; LOUTET, M. G.; O'CONNOR, C.; KEARNS, C.; SMITH, R. M. M.; LALOR, M. K.; THOMAS, H. L.; ABUBAKAR, I.; ZENNER, D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans in England, Wales, and Northern Ireland, 2002–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 377-386, 2017.

DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, R.S. *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.2, p.190-210, 2006.

DE LISLE, G.W.; GREEN, R.S.; BUDDLE, B.M. Factors affecting the gamma interferon test

in the detection of bovine tuberculosis in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.29, p.198–202, 2017.

DEGGIM-MESSMER, V.; BLOEMBERG, G.V.; RITTER, C.; VOIT, A.; HÖMKE, R.; KELLER, P.M.; BÖTTGER, E.C. Diagnostic Molecular Mycobacteriology in Regions With Low Tuberculosis Endemicity: Combining Real-time PCR Assays for Detection of Multiple Mycobacterial Pathogens With Line Probe Assays for Identification of Resistance Mutations. **EBioMedicine**, v.9, p.228-237, 2016.

DÉSIRE, I.; CYRILLE, B.; FLORENCIA, D.; SOUBA, D.; ALBERT, Y.; VALERIE, B.J.; REBECCA, C.; CHARLEMAGNE, G.; TAMBOURA, D.; RÉMY, M.; VIRGINIO, P.; SIMPLICE, K.D.; MARTIAL, O.; JACQUES, S. Diagnostic moléculaire du complexe *Mycobacterium tuberculosis* résistant à l'isoniazide et à la rifampicine au Burkina Faso [Molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* complex resistant to isoniazid and rifampicin in Burkina Faso]. **Pan African Medical Journal**, v.21, n.73, 5494, 2015.

DONNELLY, C.A.; WOODROFFE, R.; COX, D.R.; BOURNE, J.; GETTINBY, G.; LE FEVRE, A.M.; MCLNERNEY, J.P.; MORRISON, W.I. Impact of localized badger culling on tuberculosis incidence in British cattle. **Nature**, v.426, n.6968, p.834-837, 2003.

DOSANJH, D.P.S.; HINKS, T.S.C.; INNES, J.A.; DEEKS, J.J.; PASVOL, G.; HACKFORTH, S.; VARIA, R.G.N.H.; DPHIL, K.A.M.; GUNATHEESAN, M.D.R.; GUYOT-REVOL, V.; LALVANI, D.M.A. Improved Diagnostic Evaluation of Suspected Tuberculosis. **Annals of Internal Medicine**, v.148, n.5, p.325- 340, 2008.

DIEDRICH, C. R.; FLYNN, J. L. HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* coinfection immunology: how does HIV-1 exacerbate tuberculosis? **Infection and Immunity**, v.79, n.4, p.1407-1417, 2011.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. **EFSA Journal**, v.13, p.4188, 2015.

EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE (AHAW).; MORE, S.; BOTNER, A.; BUTTERWORTH, A.; CALISTRI, P.; DEPNER, K.; EDWARDS, S.; GARIN-BASTUJI, B.; GOOD, M.; GORTÁZAR SCHMIDT, C.; MICHEL, V.; MIRANDA, M.A.; NIELSEN, S.S.; RAJ, M.; SIHVONEN, L.; SPOOLDER, H.; STEGEMAN, J.A.; THULKE, H.H.; VELARDE, A.; WILLEBERG, P.; WINCKLER, C.; BALDINELLI, F.; BROGLIA, A.; CANDIANI, D.; BELTRÁN-BECK, B.; KOHNLE, L.; BICOUT, D. Assessment of listing and categorization of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): Border disease. **EFSA Journal**, v.15, n.10, e04993, 2017.

EGBE, N.F.; MUWONGE, A.; NDIP, L.; KELLY, R.F.; SANDER, M.; TANYA, V.; NGWA, V.N.; HANDEL, I.G.; NOVAK, A.; NGANDALO, R.; MAZERI, S.; MORGAN, K.L.; ASUQUO, A.; DE C BRONSVOORT, B.M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Cameroon. **Scientific Reports**, v., n.1, p. 4652, 2017.

ELSAYED, M.S.A.E.; AMER, A. The rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from cattle and water buffaloes in the delta area of Egypt, using a combination of real-time and conventional PCR. **Molecular Biology Reports**, v.46, n.4, p.3909-3919, 2019.

ELSOHABY, I.; AHMED, H.A.; EL-DIASTY, M.M.; ELGEDAWY, A.A.; MAHROUS, E.; EL HOFY, F.I. Serological and molecular evidence of *Mycobacterium bovis* in dairy cattle and dairy farm workers under the intensive dairy production system in Egypt. **Journal of Applied Microbiology**, v.129, v.5, p.1207-1219, 2020.

EMANUELSON, U.; SCHERLING, K.; PETTERSSON, H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.12, p.121-131, 1992.

ERSKINE, R.J.; CORL, C.M.; GANDY, J.C.; SORDILLO, L.M. Effect of infection with bovine leukosis virus on lymphocyte proliferation and apoptosis in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, n.8, p.1059-64, 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 21, n. 12, e8442, 2023.

EZENWA, V.O.; ETIENNE, R.S.; LUIKART, G.; BEJA-PEREIRA, A.; JOLLES, A. Hidden consequences of living in a wormy world: nematode-induced immune suppression facilitates tuberculosis invasion in African buffalo. **The American Naturalist**, v.176, n.5, p.613-24, 2010.

FERNANDES, C.H.C.; DE MELO, L.E.H.; TENÓRIO, T.G.S.; MENDESE.I.; FERNANDES, A.C.C.; RAMALHO, T.R.R.; MOURA SOBRINHO, P.A.; MOTA, R.A. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.327–334, 2021.

FERREIRA NETO, J. S.; BARBOSA, R. G.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; BAQUERO, O. S.; MACHADO, S. Z. TELLES, E. O. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Tocantins, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, supl. 1, p. 1673-1684, 2021.

FERREIRA-NETO, J. S.; DA SILVEIRA, G.B.; ROSA, B.M.; GONÇALVES, V.S.P.; GRISI-FILHO, J.H.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, E.O.; LAGE, A.P. Analysis of 15 years of the national program for the control and eradication of animal brucellosis and tuberculosis, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**. v.37, n.5, p.3385-3402, 2016.

FIELDING, H.R.; MCKINLEY, T.J.; DELAHAY, R.J.; SILK, M.J.; MCDONALD, R.A. Characterization of potential superspreader farms for bovine tuberculosis: A review. **Veterinary Medicine and Science**, v.7, n.2, p.310-321, 2021.

FLYNN, R.J.; MANNION, C.; GOLDEN, O.; HACARIZ, O.; MULCAHY, G. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, v.75, n.3, p.1373-1381, 2007.

FONTANA, S.; PACCIARINI, M.; BOIFAVA, M.; PELLESI, R.; CASTOB.; GASTALDELLI, M.; KOEHLER, H.; POZZATO, N.; CASALINUOVO, F.; BONIOTTI, M. B. Development and Evaluation of Two Multi-Antigen Serological Assays for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle. **Journal of Microbiological Methods**, v.153, p.118–126, 2018.

FRIE, M.C.; COUSSENS, P.M. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.163, n.3-4, p.103-14, 2015.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P.R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B.G.; COLE, S.T.; GORDON, S.V.; HEWINSON, R.G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.13, p.7877-7882, 2003.

GEISEL, R.E.; SAKAMOTO, K.; RUSSELL, D.G.; RHOADES, E.R. In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin is due principally to trehalose mycolates. **Journal of Immunology**, v.174, n.8, p.5007-15, 2005.

GETAHUN, M.; BLUMBERG, H.M.; SINSHAW, W.; DIRIBA, G.; MOLLALIGN, H.; TESFAYE, E.; YENEW, B.; TADDESS, M.; ZEWDIE, A.; DAGNE, K.; BEYENE, D.; KEMPKER, R.R.; AMENI, G. Low Prevalence of *Mycobacterium bovis* in Tuberculosis Patients, Ethiopia. **Emerging Infectious Diseases**, v.26, n.3, p.613-615, 2020.

GHAZAEI, C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. **Journal of Research in Medical Sciences**, v.23, p.63, 2018.

GHEBREMARIAM, M.K.; RUTTEN, V.P.; VERNOOIJ, J.C.; UQBAZGHI, K.; TESFAALEM, T.; BUTSUAMLAK, T.; IDRIS, A.M.; NIELEN, M.; MICHEL, A.L.

Prevalence and risk factors of bovine tuberculosis in dairy cattle in Eritrea. **BMC Veterinary Research**, v.12, p.80, 2016.

GHIEMMETTI, G.; LANDOLT, P.; FRIEDEL, U.; MORACH, M.; HARTNACK, S.; STEPHAN, R.; SCHMITT, S. Evaluation of Three Commercial Interferon- γ Assays in a Bovine Tuberculosis Free Population. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, 682466, 2021.

GIDEON, H.P.; SKINNER, J.A.; BALDWIN, N.; FLYNN, J.L.; LIN, P.L. Early whole blood transcriptional signatures are associated with severity of lung inflammation in cynomolgus macaques with *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Journal of Immunology**, v.197, n.12, p.4817–4828, 2016.

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A.B.; DEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v.4, n.18, 2007.

GILLET, N.A.; GUTIÉRREZ, G.; RODRIGUEZ, S.M.; DE BROGNIEZ, A.; RENOTTE, N.; ALVAREZ, I.; TRONO, K.; WILLEMS, L. Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. **Plos Pathogens**, v.9, n.10, 2013.

GIUSTI, A.; GASPARRI, M.; CARBONE, S.; RICCHI, M.; BERTELLI, S.; ARRIGONI, N. An Overview of a Re-Emerging Disease in Italy: Bovine Tuberculosis Outbreaks in Cattle from MTBC-Free Territories. **Pathogens**, v. 13, n. 11, 962, 2024.

GLAZKO, V.I.; KOSOVSKY, G.Y. Structure of genes coding the envelope proteins of the avian influenza A virus and bovine leucosis virus. **Russian Agricultural Sciences**, v.39, n.5-6, p.511–515, 2013.

GONG, Q.L.; CHEN, Y.; TIAN, T.; WEN, X.L.D.; SONG, Y.H.; WANG, Q.; DU, R.; ZHANG, X.X. Prevalence of bovine tuberculosis in dairy cattle in China during 2010-2019: A

systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.15, n.6, e0009502, 2021.

GONZALO-ASENSIO, J.; AGUILO, N.; MARINOVA, D.; MARTIN C. Breaking Transmission with Vaccines: The Case of Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v.5, n.4, p.1128, 2017.

GREGORY, L.; CARRILLO GAETA, N.; ARAÚJO, J.; MATSUMIYA THOMAZELLI, L.; HAKAKAWA, R.; IKUNO, A.A.; HIROMI OKUDA, L.; DE STEFANO, E.; PITUCO, E.M. Bovine leukaemia virus genotypes 5 and 6 are circulating in cattle from the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.66, n.12, p.1790-1797, 2017.

GRIFFA, N.; MOYANO, R.D.; CANAL, A.M.; TRAVERÍA, G.E.; SANTANGELO, M.P.; ALONSO, N.; ROMANO, M.I. Development and Diagnostic Validation of an ELISA Based on an Antigenic Mixture for the Detection of Bovine Tuberculosis. **Veterinary Journal**, v.256, 105426, 2020.

GUTIERREZ, M.G.; MASTER, S.S.; SINGH, S.B.; TAYLOR, G.A.; COLOMBO, M.I.; DERETIC, V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. **Cell**, v.119, n.6, p.753-66, 2004.

HAMED, M.G.; GÓMEZ-LAGUNA, J.; LARENAS-MUÑOZ, F.; MAHMOUD, A.Z.; ALI FAZ, ABD-ELGHAFAR, S.K. Monitoring the immune response of macrophages in tuberculous granuloma through the expression of CD68, iNOS and HLA-DR in naturally infected beef cattle. **BMC Veterinary Research**, v.19, n.1, p.220, 2023.

HEIDMAN, M.; FISCHER, V.L.; DE CASTRO, B.G. Enzootic bovine leukosis antibodies in cattle from mid-northern Mato Grosso State, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-4, 2015.

HILDEBRAND, R.E.; CHANDRASEKAR, S.S.; RIEL, M.; TOURAY, B.J.B.;

ASCHENBROICH, S.A.; TALAAT, A.M. Superinfection with SARS-CoV-2 Has Deleterious Effects on *Mycobacterium bovis* BCG Immunity and Promotes Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology Spectrum**, v.10, n.5, e0307522, 2022.

HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 107-128, 1997.

HUGHES, M.S.; BALL, N.W.; MCCARROLL, J.; ERSKINE, M.; TAYLOR, M.J.; POLLOCK, J.M.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Molecular analyses of mycobacteria other than the *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. **Veterinary Microbiology**, v.108, n.1-2, p.101-12, 2005.

IKUTA, CY.; OLIVEIRA, D.C.R.; DE SOUZA, G.O.; DE SOUZA FILHO, A.F.; GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B.; NETO, J.S.F. Comparison of DNA extraction protocols to detect *Mycobacterium bovis* in bovine tissue by PCR. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.3709–3718, 2016.

ISSA, M.D.A.; SOARES FILHO, P.M.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; HODON, M.A.; SANTOS, L.C.D.; REIS, J.K.P.D.; CERQUEIRA LEITE, R. Comparative study of *Mycobacterium bovis* primary isolation methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.48, n.1, p. 139-144, 2017.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v.5, 514, 2014.

JANG, Y. H.; KIM, T. W.; JEONG, M. K.; SEO, Y. J.; RYOO, S.; PARK, C. H.; KANG, S. S.; LEE, Y. J.; YOON, S. S.; KIM, J. M. Introduction and Application of the Interferon- γ Assay in the National Bovine Tuberculosis Control Program in South Korea. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, n.222, 2022.

JIMBA, M.; TAKESHIMA, S.N.; MATOBA, K.; ENDOH, D.; AIDA, Y. BLV-CoCoMo-

qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. **Retrovirology**, v.7, n.91, 2010.

JIMBA, M.; TAKESHIMA, S.N.; MURAKAMI, H.; KOHARA, J.; KOBAYASHI, N.; MATSUHASHI, T.; OHMORI, T.; NUNOYA, T.; AIDA, Y. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. **BMC Veterinary Research**, v.8, n.167, 2012.

JIMENEZ, D.L.F.; VALLE, C.R. Leucose enzoótica bovina -revisão. **PUBVET**, v.7, n.21, p. 2088-2188, 2013.

JOHN, E.E.; KEEFE, G.; CAMERON, M.; STRYHN, H.; MCCLURE, J.T. Development and implementation of a risk assessment and management program for enzootic bovine leukosis in Atlantic Canada. **Journal of Dairy Science**, v.103, n.9, p.8398-8406, 2020.

JUSTUS, W.; VALLE, S.; BARTON, O.; GRESHAM, A.; SHANNON, G. A review of bovine tuberculosis transmission risk in European wildlife communities. **Mammal Review**, v.54, n.3, p. 325-340, 2024.

KAGINA, B.M.N.; ABEL, B.; SCRIBA, T.J.; HUGHES, E.A.; KEYSER, A.; SOARES, A.; GAMIELDIEN, H.; SIDIBANA, M.; HATHERILL, M.; GELDERBLOEM, S.; MAHOMED, H.; HAWKRIDGE, A.; HUSSEY, G.; KAPLAN, G.; HANEKOM, W.A. And other members of the South African Tuberculosis Vaccine Initiative Specific T-cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after vaccination of newborns with bacillus Calmette-Guérin Vaccination of Newborns. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.182, n.8, p.1073-1079, 2010.

KAO, R.R.; GRAVENOR, M.B.; CHARLESTON, B.; HOPE, J.C.; MARTIN, M.; HOWARD, C.J. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Royal Society Interface**, v.4, n.14, p.545-51, 2007.

KAROLEMEAS, K.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; COOPER, R.; GOODCHILD, A.V.; CLIFTON-HADLEY, R.S.; CONLAN A.J.K.; MITCHELL, A.P.; HEWINSON, R.G.; DONNELLY, C. A.; WOOD, J.L.N.; MCKINLEY, T.J. Estimation of the *relative* sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. **Plos One**, v.7, e43217, 2012.

KASIR, D.; OSMAN, N.; AWIK, A.; EL RATEL, I.; RAFEL, R.; AL KASSAA, I.; EL SAFADI, D.; SALMA, R.; EL OMARI, K.; CUMMINGS, K.J.; KASSEM, I.I.; OSMAN, M. Zoonotic Tuberculosis: A Neglected Disease in the Middle East and North Africa (MENA) Region. **Diseases**, v.11, n.1, p.39, 2023.

KAWKA, M.; PŁOCIŃSKA, R.; PŁOCIŃSKI, P.; PAWEŁCZYK, J.; SŁOMKA, M.; GATKOWSKA, J.; DZITKO, K.; DZIADEK, B.; DZIADEK, J. The functional response of human monocyte-derived macrophages to serum amyloid A and *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Frontiers in Immunology**, v.15, n.14, 1238132, 2023.

KELLY, R.F.; GONZALÉZ GORDON, L.; EGBE, N.F.; FREEMAN, E.J.; MAZERI, S.; NGWA, V.N.; TANYA, V.; SANDER, M.; NDIP, L.; MUWONGE, A.; MORGAN, K.L.; HANDEL, I.G.; BRONSVOORT, B.M.D.C. Bovine Tuberculosis *Antemortem* Diagnostic Test Agreement and Disagreement in a Naturally Infected African Cattle Population. **Frontiers in Veterinary Science**, v.9, 877534, 2022.

KHAIRULLAH, A.R.; MOSES, I.B.; KUSALA, M.K.J.; TYASNINGSIH, W.; AYUTI, S.R.; RANTAM, F.A.; FAUZIAH, I.; SILAEN, O.S.M.; PUSPITASARI, Y.; ARYALOKA, S.; RAHARJO, H.M.; HASIB, A.; YANESTRIA, S.M.; NURHIDAYAH, N. Unveiling insights into bovine tuberculosis: A comprehensive review. **Open Veterinary Journal**, v.14, n.6, p.1330-1344, 2024.

KHALID, H.; PIERNEEF, L.; VAN HOOIJ, A.; ZHOU, Z.; DE JONG, D.; TJON KON FAT, E.; CONNELLEY, T.K.; HOPE, J.C.; CORSTJENS, P.L.A.M.; GELUK, A. Development of lateral flow assays to detect host proteins in cattle for improved diagnosis of bovine tuberculosis. **Frontiers in Veterinary Science**, v.10, 1193332, 2023.

KIA, P.; RUMAN, U.; PRATIWI, A. R.; HUSSEIN, M. Z. Innovative Therapeutic Approaches Based on Nanotechnology for the Treatment and Management of Tuberculosis. **International Journal Nanomedicine**, v.8, n.18, p.1159-1191, 2023.

KOBAYASHI, S.; TSUTSUI, T.; YAMAMOTO, T.; HAYAMA, Y.; MUROGA, N.; KONISHI, M.; KAMEYAMA, K.; MURAKAMI, K. The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.77, n.7, p.861–863, 2015.

KOBAYASHI, T.; INAGAKI, Y.; OHNUKI, N.; SATO, R.; MURAKAMI, S.; IMAKAWA, K. Increasing Bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leucosis: A prospective study in Japan. **Preventive Veterinary Medicine**, v.178,104680, 2019.

KOCK, R.; MICHEL, A.L.; YEBOAH-MANU, D.; AZHAR, E.I.; TORRELLES, J.B.; CADMUS, S.I.; BRUNTON, L.; CHAKAYA, J.M.; MARAIS, B.; MBOERA, L.; RAHIM, Z.; HAIDER, N.; ZUMLA, A. Zoonotic Tuberculosis - The Changing Landscape. **International Journal of Infectious Diseases**, v.113, p.68-72, 2021.

KOHARA, J.; BAI, L.; TAKESHIMA, S.N.; MATSUMOTO, Y.; HIRAI, T.; AIDA, Y. Correlation between the Biodistribution of Bovine Leukemia Virus in the Organs and the Proviral Load in the Peripheral Blood during Early Stages of Experimentally Infected Cattle. **Pathogens**, v.12, n.1, p.130, 2023.

KONCH, P.; DUTTA, B.; GOSWAMI, S.; SAIKIA, G. Prevalence of bovine tuberculosis in Assam, India. **International Journal of Chemical Studies**, v.5, n.3, p.143-146, 2017.

KRASILNIKOV, I.; LEHNHERR-ILYINA, T.; DJONOVIC, M.; ARTAMONOVA, I.; NIKITIN, M.; KISLICHKIN, N. Cracking the antigenic code of mycobacteria: CFP-10/ESAT-6 tuberculosis skin test and misleading results. **Journal of Clinical Tuberculosis & Other**

Mycobacterial Diseases, v. 36, p. 100436, 2024.

KUCZEWSKI, A.; HOGEVEEN, H.; ORSEL, K.; WOLF, R.; THOMPSON, J.; SPACKMAN, E.; VAN DER MEER, F. Economic evaluation of 4 bovine leukemia virus control strategies for Alberta dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.3, 2578-2592, 2019.

KURIA, J.K. Diseases Caused by Bacteria in Cattle: Tuberculosis. **Bacterial Cattle Diseases**, p.1–21, 2019.

LARENAS-MUÑOZ, F.; SÁNCHEZ-CARVAJAL, J.M.; GALÁN-RELAÑO, Á.; RUEDAS-TORRES, I.; VERA-SALMORAL, E.; GÓMEZ-GASCÓN, L.; MALDONADO, A.; CARRASCO, L.; TARRADAS, C.; LUQUE, I.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, I.M.; GÓMEZ-LAGUNA, J. The Role of Histopathology as a Complementary Diagnostic Tool in the Monitoring of Bovine Tuberculosis. **Frontiers in Veterinary Science**, v.9, 816190, 2022.

LAVANYA, M.; KINET, S.; MONTEL-HAGEN, A.; MONGELLAZ, C.; BATTINI, J.L.; SITBON, M.; TAYLOR, N. Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement. **Journal of Immunology**, v.181, n.2, p.891-898, 2008.

LE, D.T.; YAMASHITA-KAWANISHI, N.; OKAMOTO, M.; NGUYEN, S.V.; NGUYEN, N.H.; SUGIURA, K.; MIURA, T.; HAGA, T. Detection and genotyping of bovine leukemia virus (BLV) in Vietnamese cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.82, n.7, p.1042-1050, 2020.

LI, X.; XIA, A.; XU, Z.; LIU, J.; FU, S.; CAO, Z.; SHEN, Y.; XIE, Y.; MENG, C.; CHEN, X.; JIAO, X. Development and evaluation of a *Mycobacterium bovis* interferon- γ enzymelinked immunospot (ELISpot) assay for detection of bovine tuberculosis. **Journal of Dairy Science**, v.105, n.7, p.6021-6029, 2022.

LIMA, D.A.R.; RODRIGUES, R.A.; ETGES, R.N.; ARAÚJO, F.R. Bovine tuberculosis in

safari park in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.41, e06719, 2021.

LIN, P.L.; COLEMAN, T.; CARNEY, J.P.; LOPRESTI, B.J.; TOMKO, J.; FILLMORE, D.; DARTOIS, V.; SCANGA, C.; FRYE, L.J.; JANSSEN, C.; KLEIN, E.; BARRY, C.E.; FLYNN, J.L. Radiologic Responses in Cynomolgus Macaques for Assessing Tuberculosis Chemotherapy Regimens. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.9, p. 4237-4244, 2013.

LITTLE, R.A. Negotiated Management Strategies for Bovine Tuberculosis: Enhancing Risk Mitigation in Michigan and the UK. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, n.81, 2019.

LV, G.; WANG, H.; WANG, J.; LIAN, S.; WU, R. Effect of BLV Infection on the Immune Function of Polymorphonuclear Neutrophil in Dairy Cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, 737608, 2021.

LYASHCHENKO, K.; COLANGELI, R.; HOUDE, M.; AL JAHDALI, H.; MENZIES, D.; GENNARO, M.L. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. **Infection and Immunity**, v.66, n.8, p.3936-3940, 1998.

LYASHCHENKO, K.P.; GREENWALD, R.; SIKAR-GANG, A.; SRIDHARA, A.A.; JOHNATHAN, A.; LAMBOTTE, P.; ESFANDIARI, J.; MAGGIOLI, M.F.; THACKER, T.C.; PALMER, M.V.; WATERS, W.R. Early Detection of Circulating Antigen and IgM-Associated Immune Complexes during Experimental *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.24, n.6, e00069-17, 2017.

MAPHASA, R.E.; MEYER, M.; DUBE, A. The Macrophage Response to *Mycobacterium tuberculosis* and Opportunities for Autophagy Inducing Nanomedicines for Tuberculosis Therapy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, 618414, 2021.

MARAWAN, M.A.; ALOUFFI, A.; EL TOKHY, S.; BADAWEY, S.; SHIRANI, I.; DAWOOD, A.; GUO, A.; ALMUTAIRI, M.M.; ALSHAMMARI, F.A.; SELIM, A. Bovine leukaemia virus: Current epidemiological circumstance and future prospective. **Viruses**, v.13, n. 11, p.

2167, 2021.

MARIANELLI, C.; ARDINI, Y.; FERRONI, L.; AMODIO, E.; LUCIA, A.; MASSERIA, F.; CAPRA, G.; FURNO, G.; CIULLA, M.; DI MARCO, V. Geo-epidemiology of animal tuberculosis and *Mycobacterium bovis* genotypes in livestock in a small, high-incidence area in Sicily, Italy. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 3, 206, 2023.

MATTEIS, G.; SCAT` A.M.C.; ZAMPIERI, M.; GRANDONI, F.; ELNAGGAR, M.M.; SCHIAVO, L.; CAPPELLI, G.; CAGIOLA, M.; CARLO, E.; DAVIS, W.C.; MARTUCCIELLO, A. Flow cytometric detection of IFN- γ production and Caspase-3 activation in CD4⁺ T lymphocytes to discriminate between healthy and *Mycobacterium bovis* naturally infected water buffaloes. **Tuberculosis**, v.1, n.139, p.1-7, 2023.

MCCALLAN, L.; BROOKS, C.; COUZENS, C.; YOUNG, F.; MCNAIR, J.; BYRNE, A.W. Assessment of serological tests for diagnosis of bovine tuberculosis. Serological test performance for bovine tuberculosis in cattle from herds with evidence of on-going infection in Northern Ireland. **Plos One**, v.16, n.4, e0245655, 2021.

MCKINLEY, T.J.; LIPSCHUTZ-POWELL, D.; MITCHELL, A.P.; WOOD, J.L.N.; CONLAN, A.J.K. Risk factors and variations in detection of new bovine tuberculosis breakdowns via slaughterhouse surveillance in Great Britain. **Plos One**, v.13, n.6, e0198760, 2018.

MEKATA, H.; SEKIGUCHI, S.; KONNAI, S.; KIRINO, Y.; HONKAWA, K.; NONAKA, N.; HORII, Y.; NORIMINE, J. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. **The Veterinary Record**, v.176, n.10, p.254, 2015.

MENDES, C. L. et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 111-114, jan./mar. 2011. Disponível em: https://biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v78_1/mendes.pdf.

MENIN, Á.; FLEITH, R.; RECK, C.; MARLOW, M.; FERNANDES, P.; PILATI, C.; BÁFICA, A. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. **Plos One**, v.8, n.1, e53884, 2013.

MICHELET, L.; DE CRUZ, K.; KAROUI, C.; TAMBOSCO, J.; MOYEN, J.L.; HÉNAULT, S.; BOSCHIROLI, M.L. Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes. **Plos One**, v.13, n.11, e0207614, 2018.

MITCHELL, J.L.; GANIS, L.; BLACKLOCK, B.T.; PETRUSHKIN, H.; HOPE, J.C.; GUNN-MOORE, D.A. Ocular Tuberculosis: More than 'Of Mice and Men'. **Ocular Immunology and Inflammation**, v.30, n.1, p.34-38, 2022.

MOENS, C.; SAEGERMAN, C.; FRETIN, D.; MARCHÉ, S. Field evaluation of two commercial serological assays for detecting bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v.159, p.125-132, 2023.

MOHAMED, A. Bovine tuberculosis at the human-livestock-wildlife interface and its control through one health approach in the Ethiopian Somali Pastoralists: A review. **One Health**, v.9, 100113, 2019.

MOHAMED, M.; MOUSSA, L.M.; MOHAMED, K.F.; SAMIR, A.; NASR, E. A.; ASHGAN, M.H.; HATEM, M.E. BACTEC MGIT 960 TM system for screening of *Mycobacterium tuberculosis complex* among cattle. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.63, p.1374, 2011.

MOL, J.P.S.; CARVALHO, T.F.; FONSECA, A.A.JR.; SALES, E.B.; ISSA, M.A.; REZENDE, L.C.; HODON, M.A.; TINOCO, H.P.; MALTA, M.C.C.; PESSANHA, A.T.; PIEREZAN, F.; MOTA, P.M.P.C.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* in a Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Journal of Comparative Pathology**, v.155, n.2-3, p.254-258, 2016.

MONAGHAN, M.; QUINN, P.J.; KELLY, A.P.; MCGILL, K.; MCMURRAY, C.; O'CROWLEY, K.; BASSETT, H.F.; COSTELLO, E.; QUIGLEY, F.C.; ROTH, J.S.; WOOD, P.R.; COLLINS, J.D. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 111-124, 1994.

MORE, S.J.; GOOD, M. Understanding and managing bTB risk: perspectives from Ireland. **Veterinary Microbiology**, v.176, n.3-4, p.209-218, 2015.

MOYANO, R.D.; ROMERO, M.A.; COLOMBATTI OLIVIERI, M.A.; ALVARADO PINEDO, M.F.; TRAVERIA, G.E.; ROMANO, M.I.; ALONSO, M.N. Development and Validation of a Novel ELISA for the Specific Detection of Antibodies against *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Based on a Chimeric Polyprotein. **Veterinary Medicine International**, v. 2021, 7336848, 2021.

MURAKAMI, K.; KOBAYASHI, S.; KONISHI, M.; KAMEYAMA, K.; TSUTSUI, T. Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009-2011. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.75, n.8, p.1123-1126, 2013.

NAKADA, S.; FUJIMOTO, Y.; KOHARA, J.; MAKITA, K. Economic losses associated with mastitis due to bovine leukemia virus infection. **Journal of Dairy Science**, v.106, p.576–588, 2023.

NAVA-VARGAS, A.; MILIÁN-SUAZO, F.; CANTÓ-ALARCÓN, G.J.; GUTIÉRREZ-PABELLO, J.A. Intracellular survival of *Mycobacterium bovis* strains with high and low frequency in cattle populations in a bovine macrophage model. **Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**, v.12, n.2, p.487–502, 2021.

NIKBAKHT BRUJENI, G.; GHORBANPOUR, R.; ESMAILNEJAD, A. Association of BoLA-DRB3.2 Alleles with BLV Infection Profiles (Persistent Lymphocytosis/Lymphosarcoma) and Lymphocyte Subsets in Iranian Holstein Cattle. **Biochemical Genetics**, v.54, n.2, p.194-207, 2016.

NOGUEIRA, L.L.; CARDOSO, F.C.; MATTOS, A.M.; BORDIGNON, J.; FIGUEIREIDO, C. P.; DAHLSTROM, P.; FROTA, C.C.; SANTOS, C.N.D.; CHALHOUB, M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, H.C.; OLIVEIRA, S.C.; BARRAL NETO, M.; BÁFICA, A. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v.40, n.3, p.744-753, 2010.

NORBY, B.; BARTLETT, P.C.; FITZGERALD, S.D.; GRANGER, L.M.; BRUNING-FANN, C.S.; WHIPPLE, D.L.; PAYEUR, J.B. The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, n.2, p.126-31, 2004.

NURU, A.; ZEWUDE, A.; MOHAMMED, T.; WONDALE, B.; TESHOME, L.; GETAHUN, M.; MAMO, G.; MEDHIN, G.; PIEPER, R.; AMENI, G. Nontuberculous mycobacteria are the major causes of tuberculosis-like lesions in cattle slaughtered at the Bahir Dar abattoir, northwestern Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v.13, n.1, p.237, 2017.

NUSBAUM, R. J.; CALDERON, V. E.; HUANTE, M. B.; SUTJITA, P.; VIJAYAKUMAR, S.; LANCASTER, K. L.; HUNTER, R. L.; ACTOR, J. K.; CIRILLO, J. D.; ARONSON, J.; GELMAN, B. B.; LISINICCHIA, J. G.; VALBUENA, G.; ENDSLEY, J. J. Pulmonary Tuberculosis in Humanized Mice Infected with HIV-1. **Scientific Reports**, v.6, 21522, 2016.

O'BRIEN, A.; CLARKE, J.; HAYTON, A.; ADLER, A.; CUTLER, K.; SHAW, D.J.; WHELAN, C.; WATT, N.J.; HARKISS, G.D. Diagnostic accuracy of the Enferplex Bovine Tuberculosis antibody test in cattle sera. **Scientific Reports**, v.13, n.1, p.1875, 2023.

OHNO, A.; TAKESHIMA, S.N.; MATSUMOTO, Y.; AIDA, Y. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. **Virus Research**, v.210, p.283-290, 2015.

OIE, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Bovine Tuberculosis. 2018.

Disponível em:

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVINE_TB.pdf.

OLEA-POPELKA, F.; MUWONGE, A.; PERERA, A.; DEAN, A.S.; MUMFORD, E.; ERLACHER-VINDEL, E.; FORCELLA, S.; SILK, B.J.; DITIU, L.; EL IDRISSE, A.; RAVIGLIONE, M.; COSIVI, O.; LOBUE, P.; FUJIWARA, P.I. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. **The Lancet Infectious Diseases**, v.17, n.1, e21-e25, 2017.

ORTEGA, J.; INFANTES-LORENZO, J. A.; BEZOS, J.; ROY, Á.; DE JUAN, L.; ROMERO, B.; MORENO, I.; GÓMEZ-BUENDÍA, A.; AGULLÓ-ROS, I.; DOMÍNGUEZ, L.; DOMÍNGUEZ, M. Evaluation of P22 ELISA for the Detection of *Mycobacterium bovis*-Specific Antibody in the Oral Fluid of Goats. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, 674636, 2021.

PALMER, M.V. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, p.1-13, 2013.

PATHAK, L.; GAYAN, S.; PAL, B.; TALUKDAR, J.; BHUYAN, S.; SANDHYA, S.; YEGER, H.; BAISHYA, D.; DAS, B. Coronavirus Activates an Altruistic Stem Cell-Mediated Defense Mechanism that Reactivates Dormant Tuberculosis: Implications in Coronavirus Disease 2019 Pandemic. **The American Journal of Pathology**, v.191, n.7, p.1255-1268, 2021.

PEREIRA, J.G.; SILVA, C.A.; SILVA, L.D.; LIMA, C.A.A.; DO ROSÁRIO, C.J.R.M.; SILVA, E.M.C.; OLIVEIRA, M.D.S.C.; RIBEIRO, L.S.D.S.; SANTOS, H.P.; ABREU-SILVA, A.L.; MELO, F.A. Diagnosis and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in dairy cattle in northeastern Brazil. **Frontiers in Veterinary Science**, v.9, 1080994, 2023.

PÉREZ-LAGO L.; COMAS I.; NAVARRO Y.; GONZALEZ-CANDELAS F.; HERRANZ M.; BOUZA E.; GARCÍA-DE- VIEDMA, D. Whole genome sequencing analysis of intrapatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v.209, n.1, p.98–108, 2014.

PÉREZ-MOROTE, R.; PONTONES-ROSA, C.; GORTÁZAR-SCHMIDT, C.; MUÑOZ-CARDONA, Á.I. Quantifying the Economic Impact of Bovine Tuberculosis on Livestock Farms in South-Western Spain. **Animals**, v.10, n.12, p.2433, 2020.

PICASSO-RISSO, C.; ALVAREZ, J.; VANDERWAAL, K.; KINSLEY, A.; GIL, A.; WELLS, S.J.; PEREZ, A. Modelling the effect of test-and-slaughter strategies to control bovine tuberculosis in endemic high prevalence herds. **Transboundary Emerging Diseases**, v.68, n.3, p.1205-1215, 2021.

PINHEIRO JUNIOR, J.W.; DE SOUZA, M.E.; PORTO, W.J.N.; LIRA, N.S.C.; MOTA, R.A. Epidemiologia da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (LEB). **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n. 2, p.258–264, 2013.

POLAT, M.; MOE, H.H.; SHIMOGIRI, T.; MOE, K.K.; TAKESHIMA, S.N.; AIDA, Y. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle. **Archives of Virology**, v.162, n.2, p.425-437, 2017.

POLAT, M.; TAKESHIMA, S.N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, v.14, n.1, p.209, 2017.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinay Journal**, v.163, n. 2, p.115-127, 2002.

POLLOCK, J.M.; MCNAIR, J.; WELSH, M.D.; GIRVIN, R.M.; KENNEDY, H.E.; MACKIE, D.P.; NEILL, S.D. Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, n.1-2, p. 103- 107, 2001.

POZO, P.; CARDENAS, N.C.; BEZOS, J.; ROMERO, B.; GRAU, A.; NACAR, J.; SAEZ, J.L.; MINGUEZ, O.; ALVAREZ, J. Evaluation of the performance of slaughterhouse surveillance for bovine tuberculosis detection in Castilla y Leon, Spain. **Preventive Veterinary**

Medicine, v.189, 105307, 2021.

PRAJWAL, P.; NEARY, T.; ROHRBACH, K.; BITTEL, P.; GÖLLER, P.C.; BUCH, T.; DÜMCKE, S.; KELLER, P.M. Optimizing mycobacteria molecular diagnostics: No decontamination! Human DNA depletion? Greener storage at 4 °C! **Frontiers in Microbiology**, v.14, 1104752, 2023.

QU, M.; LIANG, Z.; CHEN, Y.; WANG, Y.; WANG, H.; LIU, Z.; LIU, Y.; DONG, Y.; GE, X.; LI, H.; ZHOU, X. Antibodies Targeting the Cell Wall Induce Protection against Virulent *Mycobacterium bovis* Infection. **Microbiology Spectrum**, v.11, n.2, e0343122, 2023.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10. ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2007.

RAHIM, Z.; THAPA, J.; FUKUSHIMA, Y.; VAN DER ZANDEN, A.G.M.; GORDON, S.V.; SUZUKI, Y.; NAKAJIMA, C. Tuberculosis Caused by *Mycobacterium orygis* in Dairy Cattle and Captured Monkeys in Bangladesh: a New Scenario of Tuberculosis in South Asia. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.64, n.6, p.1965-1969, 2017.

RAHLWES, K.C.; DIAS, B.R.S.; CAMPOS, P.C.; ALVAREZ-ARGUEDAS, S.; SHILOH, M.U. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Virulence**, v.14, n.1, 2150449, 2023.

RAHMAN, M.T.; SOBUR, M.A.; ISLAM, M.S.; IEVY, S.; HOSSAIN, M.J.; EL ZOWALATY, M.E.; RAHMAN, A.T.; ASHOUR, H.M. Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. **Microorganisms**, v.12, n.8-9, p.1405, 2020.

RAKOTOSAMIMANANA, N.; RABODOARIVELO, M.S.; PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; RAZANAMPARANY, V.R. Exploring tuberculosis by molecular tests on DNA isolated from smear microscopy slides. **International Journal of Infectious Diseases**, v.56, p.248-252,

2017.

RAMALHO, G.C.; SILVA, M.L.C.R.; FALCÃO, B.M.R.; LIMEIRA, C.H.; NOGUEIRA, D.B.; DOS SANTOS, A.M.; MARTINS, C.M.; ALVES, C.J.; CLEMENTINO, I.J.; DE SOUSA, A.B.S.C, DE AZEVEDO, S.S. High herd-level seroprevalence and associated factors for bovine leukemia virus in the semi-arid Paraíba state, Northeast Region of Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.190, 105324, 2021.

RAMANUJAM, H.; PALANIYANDI, K. Bovine tuberculosis in India: The need for One Health approach and the way forward. **One Health**, v.16, 00495, 2023.

RAMOS, D.F.; SILVA, P.E.; DELLAGOSTIN, O.A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal Biology**, v.75, n.4, p.830-837, 2015.

RIVIÈRE, J.; CARABIN, K.; LE STRAT, Y.; HENDRIKX, P.; DUFOUR, B. Bovine tuberculosis surveillance in cattle and free-ranging wildlife in EU Member States in 2013: a survey-based review. **Veterinary Microbiology**, v.173, n.3-4, p.323-31, 2014.

RODAKIEWICZ, S.M.; FERNANDEZ, M.L.; MUNHOZ, M.L.; YAMAKAWA, F.H.S.; URIO, M.; FORELL, F.; FERRAZ, S.; PORTES, V.M.; DA COSTA, U.M. Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.85, 1-7, e0742016, 2018.

RODRIGUES, D.L.; AMORIM, E.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; BAQUERO, O.S.; GRISI FILHO, J.H.H.; DIAS, R.A.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, E.O.; GONÇALVES, V.S.P.; COMPTON, C., FERREIRA NETO, J.S. Apparent prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Paraná, Brazil: an assessment after 18 years since the beginning of the Brazilian program. **Tropical Animal Health and Production**, v.54, p.360, 2022.

RODRIGUES, R.A.; MENESES, I.I.F.S.; JORGE, K.S.G.; SILVA, M.R.; SANTOS, L.R.;

LILENBAUM, W.; ETGES, R.N.; ARAÚJO, F.R. False-Negative Reactions to the Comparative Intradermal Tuberculin Test for Bovine Tuberculosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.12, p.1380–1384, 2017.

ROSEWICK, N.; DURKIN, K.; ARTESI, M.; MARÇAIS, A.; HAHAUT, V.; GRIEBEL, P.; ARSIC, N.; AVETTAND-FENOËL, V.; BURNY, A.; CHARLIER, C.; HERMINE, O.; GEORGES, M.; VANDENBROEKE, A. Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. **Nature Communications**, v. 8, art. 15264, 2017.

RUGGIERO, V.J.; BARTLETT, P.C. Control of Bovine Leukemia Virus in Three US Dair Herds by Culling ELISA-Positive Cows. **Veterinary Medicine International**, v.2019, n.1, 3202184, 2019.

RUIZ, V.; PORTA, N.; LOMÓNACO, M.; TRONO, K.; ALVAREZ, I. Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, n.267, 2018.

SAKAMOTO, S.; PUTALUN, W.; VIMOLMANGKANG, S.; PHOOLCHAROEN, W.; SHOYAMA, Y.; TANAKA, H.; MORIMOTO, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. **Journal of Natural Medicines**, v.72, n.1, p.32-42, 2018.

SANTOS, E., FEHLBERG, I., FERNANDES, B., DE ALCÂNTARA, A., SILVA, B.E CERQUEIRA, R. Detection of *Mycobacterium* sp. by multiplex PCR directly from suspicious granulomas from cold chambers in the state of Bahia, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.88, n.1, p.1–8, 2020.

SANTOS, N.; COLINO, E.F.; ARNAL, M.C.; DE LUCO, D.F.; SEVILLA, I.; GARRIDO, J.M.; FONSECA, E.; VALENTE, A.M.; BALSEIRO, A.; QUEIRÓS, J.; ALMEIDA, V.; VICENTE, J.; GORTÁZAR, C.; ALVES, P.C. Complementary roles of wild boar and red deer to animal tuberculosis maintenance in multi-host communities. **Epidemics**, v.21, n.41, 100633,

2022.

SATO, H.; FUKUI, J.N.; HIRANO, H.; OSSADA, H.; ARIMURA, Y.; MASUDA, M.; AINDA, Y. Application of the Luminescence Syncytium Induction Assay to Identify Chemical Compounds That Inhibit Bovine Leukemia Virus Replication. **Viruses**, v.15, n.1, p.4, 2022.

SATTAR, A.; ZAKARIA, Z.; ABU, J.; AZIZ, S.A.; ROJAS-PONCE, G. Isolation of *Mycobacterium avium* and other nontuberculous mycobacteria in chickens and captive birds in peninsular Malaysia. **BMC Infectious Diseases**, v.17, n.13, 2021.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H.M.; PALMER, M.V.; HARRIS, B.N.; ORLOSKI, K.A.; BUDDLE, B.M.; THACKER, T.C.; LYASHCHENKO, K.P; WATERS, W. R. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.57, n.4, p.205-220, 2010.

SIERRA, A.; CAMELO, D.; LOTA, C.; ARENAS, N.E.; SOTO, C.Y. Specific identification of *Mycobacterium bovis* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) targeting the Region of Difference 12 (RD12) of the *M. tuberculosis* complex. **MethodsX**, v.10,102223, 2023.

SMITH, K.; BERNITZ, N.; GOLDSWAIN, S.; COOPER, D.V.; WARREN, R.M.; GOOSEN, W.J.; MILLER, M.A. Optimized interferon-gamma release assays for detection of *Mycobacterium bovis* infection in African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.231, 110163, 2021.

SMITH, K.; KLEYNHANS, L.; WARREN, R.M.; GOOSEN, W.J.; MILLER, M.A. Cell-Mediated Immunological Biomarkers and Their Diagnostic Application in Livestock and Wildlife Infected with *Mycobacterium bovis*. **Frontiers in Immunology**, v.12, p.639605, 2021.

SOARES FILHO, P.M.; RAMALHO, A.K.; DE MOURA SILVA, A.; HODON, M.A.; DE

AZEVEDO ISSA, M.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; MOTA, P.M.P.C.; SILVA, C.H.O.; DOS REIS, J.K.P.; LEITE, R.C. Evaluation of *post-mortem* diagnostic tests' sensitivity and specificity for bovine tuberculosis using Bayesian latent class analysis. **Research in Veterinary Science**, v.125, p.14-23, 2019.

SOARES FILHO, P.M.; RAMALHO, A.K.; SILVA, A.M.; ISSA, M.A.; MOTA, P.M.P.C.; SILVA, C.H.O.; RIBEIRO, A.C.C.L.; REI, J.K.P.; LEITE, R.C. Diagnostic Performance of a Commercial ELISA Used as a Complementary Test for Bovine Tuberculosis in Two Bovine Herds with Different Disease Status. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, p. 1–8, 2020.

SOLDEVILLA, P.; MARTÍNEZ, A.; PÉREZ, L.; GONZÁLEZ, M.; FERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ, J.; RAMÍREZ, C.; TORRES, E.; MORALES, D. Efficacy of RUTI® immunotherapy against active tuberculosis in a mouse model challenges the Koch phenomenon. **Frontiers in Tuberculosis**, v.1, 1240684, 2023.

SOMURA, Y.; SUGIYAMA, E.; FUJIKAWA, H.; MURAKAMI, K. Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. **Archives of Virology**, v.159, n.10, p.2693-2697, 2014.

SOUZA, I.I.F.; RODRIGUES, R.A.; GONÇALVES JORGE, K.S.; SILVA, M.R.; LILENBAUM, W.; VIDAL, C.E.S.; ETGES, R.N.; KOSTOVIC, M.; ARAÚJO, F.R. ELISA using a recombinant chimera of ESAT-6/MPB70/MPB83 for *Mycobacterium bovis* diagnosis in naturally infected cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.81, n.1, p.9–14, 2019.

SRINIVASAN, S.; CONLAN, A.J.K.; EASTERLING, L.A.; HERRERA, C.; DANDAPAT, P.; VEERASAMI, M.; AMENI, G.; JINDAL, N.; RAJ, G.D.; WOOD, J.; JULEFF, N.; BAKKER, D.; VORDERMEIER, M.; KAPUR, V. A Meta-Analysis of the Effect of Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Against Bovine Tuberculosis: Is Perfect the Enemy of Good? **Frontiers in Veterinary Science**, v.18, n.8, 637580, 2021.

STAVINHOVA, R.; O'HALLORAN, C.; NEWTON, J.R.; OLIVER, J.A.C.; SCURRELL, E.; GUNN-MOORE, D.A. Feline Ocular Mycobacteriosis: Clinical Presentation, Histopathological Features, and Outcome. **Veterinary Pathology**, v.56, n.5, p.749-760, 2019.

STONE, D.M.; HOF, A.J.; DAVIS, W.C. Up-regulation of IL-2 receptor alpha and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, n.1-2, p. 65-76, 1995.

STONE, D.M.; NORTON, L.K.; CHAMBERS, J.C.; MEEK, W.J. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. **Clinical Immunology**, v.96, n.3, p.280-288, 2000.

SWEETLINE ANNE, N.; RONALD, B.S.; KUMAR, T.M.; KANNAN, P.; THANGAVELU, A. Molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis* in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.198, p.81-87, 2017.

SWEETLINE ANNE, N.; RONALD, B.S.M.; SENTHIL KUMAR, T.M.A.; THANGAVELU, A. Conventional and molecular determination of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* isolates in cattle. **Tuberculosis**, v.114, p.113-118, 2019.

TAJIMA, S.; IKAWA, Y.; AIDA, Y. Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. **Journal Virology**, v.72, n.9. p.7569–7576, 1998.

TAJIMA, S.; ZHUANG, W.Z.; KATO, M.V.; OKADA, K.; IKAWA, Y.; AIDA, Y. Function and conformation of wild-type p53 protein are influenced by mutations in bovine leukemia virus-induced B-cell lymphosarcoma. **Virology**, v.243, n.1, p.735-746, 1998.

TAYLOR, G.M.; WORTH, D.R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R.G. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research** v.3, n.12, 2007.

TAYLOR, S.J.; AHONEN, L.J.; DE LEIJ, F.A.; DALE, J.W. Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, v.69, n.7, p.4316-4319, 2003.

TEIXEIRA, H.C.; ABRAMO, C.; MUNK, M.E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.33, n.3, p.323-334, 2007.

The World Organization for Animal Health (WOAH/OIE), Bovine tuberculosis, (http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BOVINE-TB-EN.pdf). 2020.

TOMÉ-PODERTI, L.; OLIVERO-DEIBE, N.; CARRIÓN, F.; PORTELA, M.M.; OBAL, G.; CABRERA, G.; BIANCHI, S.; LIMA, A.; ADDIEGO, A.; DURÁN, R.; MORATÓRIO, G.; PRITSCH, O. Characterization and application of recombinant Bovine Leukemia Virus Env protein. **Scientific Reports**, v.14, 12190, 2024.

TORRES-GONZALEZ, P.; CERVERA-HERNANDEZ, M.E.; MARTINEZ GAMBOA, A.; GARCIA-GARCIA, L.; CRUZ-HERVERT, L.P.; DEL-VALLE, M.B.; PONCE –DE LEON, A.; SIFUENTES-OSORNIO, J. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: a retrospective comparison with *Mycobacterium tuberculosis* in a Mexican tertiary care centre, 2000- 2015. **BMC Infectious Diseases**, v.16, n.657, 2016.

TRAININ, Z.; BRENNER, J.; MEIROM, R.; UNGAR-WARON, H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.54, n.1-4, p. 293–302, 1996.

TROIANO, L.D.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AGOTTANI, J.V.; BRODZINSKI, J.; PENHA, T.R.; OZAKI, S.C. Production, Characterization, and Use of Monoclonal Antibodies Against gp51 Protein to Diagnose Bovine Leukemia Virus Infection. **Bioresearch Open Access**, v.2, n.1, p.55-60, 2013.

TULU, B.; ZEWEDE, A.; BELAY, M.; ZELEKE, M.; GIRMA, M.; TEGEGN, M.; IBRAHIM, F.; JOLLIFFE D.A.; ABEBE, M.; BALCHA, T.T.; GUMI, B.; MARTINEAU, H.M.; MARTINEAU, A.R.; AMENI, G. Epidemiology of Bovine Tuberculosis and Its Zoonotic Implication in Addis Ababa Milkshed, Central Ethiopia. **Frontiers in Veterinary Science**, v.17, n.8, 595511, 2021.

USABIAGA, J. Brucellosis and bovine tuberculosis: control or elimination? In: inter-american meeting, at the ministerial level, on health 92 and agriculture, v. 12, São Paulo, Brazil. Proceedings. São Paulo: **PHO**, 2001.

VONÈCHE, V.; PORTETELLE, D.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L.; LIMBACH, K.; PAOLETTI, E.; RUYSSCHAERT, J.M.; BURNY, A.; BRASSEUR, R. Fusogenic segments of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.189, n.9, 3810-4, 1992.

VORDERMEIER, H.M.; WHELAN, A.; HEWINSON, G. The scientific case for the gamma interferon "BOVIGAM™" assay. **Government Veterinary Journal**, v.19, p.38-43, 2008.

WALAZA, S.; COHEN, C.; TEMPIA, S.; MOYES, J.; NGUWENEZA, A.; MADHI, S.A.; MCMORROW, M.; COHEN, A.L. Influenza and tuberculosis co-infection: A systematic review. *Influ. Other Respir. Viruses*, v.14, p.77–91, 2019.

WALCH, P.; BROZ, P. Viral-bacterial co-infections screen in vitro reveals molecular processes affecting pathogen proliferation and host cell viability. **Nature Communications**, v.15, 8595, 2024.

WALLIN, M.; EKSTROM, M.; GAROFF, H. The fusion-controlling disulfide bond isomerase in retrovirus Env is triggered by protein destabilization. **Journal Virology**, v.79, p.1678–1685, 2005.

WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **Journal of comparative pathology**, v.133, n.4, p.223-34, 2005.

WATANUKI, S.; SHOJI, K.; IZAWA, M.; OKAMI, M.; YE, Y.; BAO, A.; LIU, Y.; SAITOU, E.; SUGIYAMA, K.; ENDO, M.; MATSUMOTO, Y.; AIDA, Y. Development of Dry and Liquid Duplex Reagent Mix-Based Polymerase Chain Reaction Assays as Novel Tools for the Rapid and Easy Quantification of Bovine Leukemia Virus (BLV) Proviral Loads. **Viruses**, v.16, n.7, p.1016, 2024.

WATANUKI, S.; TAKESHIMA, S.N.; BORJIGIN, L.; SATO, H.; BAI, L.; MURAKAMI, H.; SATO, R.; ISHIZAKI, H.; MATSUMOTO, Y.; AIDA, Y. Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. **Veterinary Research**, v.50, n.102, 2019.

WATERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; VORDERMEIER, H.M.; GORMLEY, E.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; BANNANTINE, J.P.; STABEL, J.R.; LINSKOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J.C. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in the Detection of Bovine Tuberculosis in Cattle. **Clinical And Vaccine Immunology**, v.18, n.11, p.1882-1888, 2011.

WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; STAFNE, M.R.; BASS, K.E.; MAGGIOLI, M.F.; THACKER, T.C.; LINSKOTT, R.; LAWRENCE, J.C.; NELSON, J.T.; ESFANDIARI, J.; GREENWALD, R.; LYASHCHENKO, K.P. Effects of serial skin testing with Purified Protein Derivative on the level and quality of antibodies to complex and defined antigens in *Mycobacterium bovis* Infected Cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.22, n.6, p.641-649, 2015.

WELLINGTON, D.; YIN, Z.; KESSLER, B. M.; DONG, T. Immunodominance complexity: lessons yet to be learned from dominant T cell responses to SARS COV-2. **Current Opinion**

in **Virology**, v.50, p.183-191, 2021.

WHELAN, C.; WHELAN, A.O.; SHURALEV, E.; KWOK, H F.; HEWINSON, G.; CLARKE, J.; VORDERMEIER, H.M. Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.5, p.813, 2010.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) IUAT and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union) Road map for zoonotic tuberculosis. Proceedings of the 48th Union World Conference on Lung Health, Guadalajara, Mexico. p.11–14 October 2017.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). Bovine tuberculosis – Factsheet: Zoonotic TB in human beings caused by *Mycobacterium bovis*: a call for action. [S.l.]: WOA, 2018. Disponível em: <https://www.woah.org>.

YATBANTOONG, N.; RUKKWAMSUK, T. A review: diagnosis of bovine tuberculosis. **Journal of Kasetsart Veterinary**, v.27, n.2, p.103–127, 2017.

YOSHIKAWA, H.; DOGRUMAN-AI, F.; TURK, S.; KUSTIMUR, S.; BALABAN, N.; SULTAN, N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples. **Parasitology Research**, v.109, n.4, p.1045-1050, 2011.

YOUNG, D.B.; GIDEON, H.P.; WILKINSON, R.J. Eliminating latent tuberculosis. **Trends in Microbiology**, v.17, n.5, p.183-188, 2009.

YU, C.; WANG, X.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHENG, Y. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China. **BMC Veterinary Research**, v.15, n.1, p.179, 2019.

ZAHARAN, M.; EL-SHABASY, R.M.; ELRASHEDY, A.; MOUSA, W.; NAYEL, M.; SALAMA, A.; ZAGHAWA, A.; ELSIFY, A. Recent progress in the genotyping of bovine tuberculosis and its rapid diagnosis *via* nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Royal Society of Chemistry advances**, v.13, n.45, p.31795-31810, 2023.

ZEINELDIN, M.; CAMP, P.; FARRELL, D.; LEHMAN, K.; THACKER, T. Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* directly from clinical tissue samples without culture. **Frontiers in Microbiology**, n.14, 1141651, 2023.

ZHAI, W.; WU, F.; ZHANG, Y.; FU, Y.; LIU, Z. The immune escape mechanisms of *Mycobacterium Tuberculosis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.2, p.340, 2019.

ZHAO, Y.; WANG, J.; CHEN, J.; CHEN, Y.; HU, C.; CHEN, X.; GUO, A. Bovine leukemia virus: origin, prevalence, phylogenetic diversity, risk factors, and strategies for control. **Animals**, v. 15, n.9, p.1344, 2025.

ZHU, X.; WANG, J.; ZHAO, Y.; ZHANG, Z.; YAN, L.; XUE, Y.; CHEN, Y.; ROBERTSON, I. A.; GUO, A.; ALERI, J. Prevalence, distribution, and risk factors of bovine tuberculosis in dairy cattle in central China. **Preventive Veterinary Medicine**, v.213, 105887, 2023.

CAPÍTULO 2

Development and evaluation of an elisa based on recombinant mb1454 antigen for detecting anti-*Mycobacterium bovis* antibodies in cattle

Publicado em:

BUENO, N.M.M.; RECK, C.; NOGUEIRA, L.L.; PINTO, A.R.; MENIN, Á. Development and evaluation of an ELISA based on recombinant Mb1454 antigen for the detection of specific anti-*Mycobacterium bovis* antibodies in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 290, p. 111025, 2025. doi: 10.1016/j.vetimm.2025.111025.

2.1 Abstract

Bovine tuberculosis (bTB), caused by *Mycobacterium bovis*, is a zoonosis of global concern due to the absence of effective vaccines or treatments. The conventional diagnostic method, the single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICTT), is limited by cost and sensitivity, hindering control strategies. To overcome these limitations, an ELISA that detects specific IgG antibodies against *M. bovis* using the recombinant protein Mb1454 was developed. The optimized ELISA conditions included 0.5 µg of recombinant Mb1454 protein for plate sensitization, PBMT blocking buffer (PBS + 1 % BSA + 3 % milk + 0.05 % Tween-20), serum dilution of 1:200, secondary antibody dilution of 1:1000, 1 h incubation, and 15 min substrate development time. The analysis of the ELISA-Mb1454 in *M. bovis*-positive (bTB+, n = 113) and negative (bTB–, n = 120) bovine serum samples showed 92.9 % sensitivity and 90.0 % specificity, with an area under the ROC curve of 0.96, indicating high discrimination capacity in *M. bovis* detection ($p < 0.0001$). The assay demonstrated high analytical specificity, with no cross-reactivity observed in sera from animals infected with other common pathogens, including BoAHV-1, BoAHV-5, BVDV, *Neospora caninum*, *Brucella abortus*, and *Leptospira* sp. The results showed no correlation between circulating IgG antibody levels against the Mb1454 antigen and the pathological stage of bovine tuberculosis (bTB) lesions. Nonetheless, our findings demonstrated the immunogenicity of the Mb1454 protein and discriminatory performance of the ELISA-Mb1454 assay in differentiating bTB-positive and -negative cattle, even in the absence of a direct association between antibody titers and disease severity.

2.2 Introduction

Mycobacterium bovis is the main etiological agent of bovine tuberculosis (bTB), a notifiable infectious anthroponosis with widespread global distribution (Dametto et al., 2020) that frequently causes significant livestock losses and impacts public health. Its primary host is cattle, but it can infect domestic and wild species, as well as humans (Romha et al., 2018). The most common route of transmission is inhalation of contaminated aerosols. However, other routes of infection, such as ingestion of contaminated milk and food (feed and water), have been reported (Ameni et al., 2011; Sweetline Anne et al., 2017). Dairy cattle are

more susceptible to *M. bovis* infection due to their increased congregate proximity during confinement periods (Byrne et al., 2022; Zhu et al., 2023).

Infection caused by *M. bovis* is difficult to diagnose (Klepp et al., 2019). Most infected animals are asymptomatic, and clinical signs typically appear in the late stages of the disease, contributing to increased transmission of the pathogen within herds (Menin et al., 2013). There are no vaccines or treatments available for bTB. The only means of control is diagnosis, followed by the culling of positive animals (Byrne et al., 2022). Its economic impact is primarily related to the culling of infected animals, reduced milk and meat production, and increased susceptibility to infectious diseases (Fielding et al., 2021). The public health impacts are most pronounced in rural areas, where approximately 30 % of human TB infections are caused by *M. bovis* (OIE, 2020). The Bovigam IFN- γ release assay is a widely used international diagnostic tool that detects cell-mediated immune responses to *Mycobacterium bovis* infection (Casal et al., 2017; McCallan et al., 2021). However, in Brazil, the most widely used diagnostic tool for detecting *M. bovis* in cattle is the single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICTT), officially recommended by the World Organisation for Animal Health (WOAH/OIE). However, this test has notable limitations, including variations in specificity and sensitivity, high operational costs, and high rates of anergic animals (Sweetline Anne et al., 2019), attributable to its reliance on the cell-mediated immune response. As the disease progresses, the immune response to *M. bovis* shifts from a T helper type 1 (Th1)-dominated profile to a T helper type 2 (Th2) response, characterized by reduced interferon-gamma (IFN- γ) production and increased antibody levels. This immunological modulation increases the utility of serological assays for detecting anti-*M. bovis* antibodies; however, it can impair the performance of tuberculin-based tests such as the SICTT (). Serological tests are a low-cost, practical, and easy-to-perform diagnostic tool, with high sensitivity and specificity, particularly in more advanced stages of the disease and cases of anergy (Britton et al., 2016; Li et al., 2022). Moreover, the combined use of diagnostic methods that evaluate cellular immune responses and humoral immune responses has been shown to markedly improve the overall sensitivity of the diagnosis of bovine tuberculosis (Casal et al., 2017; McCallan et al., 2021). In this context, we developed and validated an indirect ELISA based on the recombinant antigen Mb1454 for the sensitive and specific detection of anti-*Mycobacterium bovis* IgG antibodies in cattle.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Ethical approval

Ethical approval was obtained from the Universidade Federal de Santa Catarina Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA-UFSC) (8278290818.4). All experimental procedures were conducted in accordance with relevant institutional and national regulations.

2.3.2 Animals and *M. bovis* infection diagnostic

The study included 233 crossbred Holstein/Jersey dairy cows, aged approximately 1.8–12 years, originating from 22 intensively managed farms in the state of Santa Catarina, Brazil. All animals underwent the single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICTT), performed according to official Brazilian regulations (MAPA, 2006; OIE, 2011). Briefly, two injection sites approximately 15 cm apart on the mid-cervical region were shaved and the skin thickness was measured using calipers. The first site was injected with 0.1 mL of purified protein derivative from *Mycobacterium bovis* (PPD-B; strain AN5; 1 mg/mL), and the second with 0.1 mL of PPD from *Mycobacterium avium* (PPD-A; strain D4; 0.5 mg/mL). Skin thickness was reassessed after 72 h, and animals were classified as SICTT-positive when the reaction at the PPD-B site was at least 4 mm greater than that at the PPD-A site (Eirin et al., 2015; OIE, 2011).

Among the tested animals, 113 serum samples were classified as bTB-positive (bTB+) based on the concordant results of three diagnostic criteria: (I) positive SICTT, (II) presence of gross lesions compatible with bovine tuberculosis, and (III) isolation of *M. bovis* by bacterial culture. These diagnoses were further confirmed using polymerase chain reaction (PCR), histopathological analysis, and Ziehl–Neelsen staining for acid-fast bacilli (AFB). An additional 120 samples were classified as bTB-negative (bTB-), based on negative results in all the same diagnostic parameters. All samples (n = 233) were tested using both the in-house indirect ELISA based on the recombinant Mb1454 antigen (ELISA-Mb1454) and the commercially available IDEXX *M. bovis* Ab test, in order to compare diagnostic performance.

To evaluate analytical specificity and potential cross-reactivity, additional serum samples were included from cattle previously confirmed as positive for other common pathogens: bovine alphaherpesvirus 1 (BoAHV-1; n = 15), bovine alphaherpesvirus 5 (BoAHV-5; n = 15), bovine viral diarrhea virus (BVDV; n = 15), *Neospora caninum* (n = 15), *Brucella abortus* (n = 15), and *Leptospira* sp. (*Leptospira interrogans*, serogroup Canicola)

(n = 15). These samples were analyzed using ELISA-Mb1454 to assess potential nonspecific antibody binding.

The bacteriological culture of *Mycobacterium bovis* was performed using tissue homogenates decontaminated by the modified Petroff method. The processed samples were inoculated onto Stonebrink and Lowenstein–Jensen media supplemented with sodium pyruvate (4.5 mg/mL) and incubated at 37 °C for up to eight weeks. Mycobacterial colonies were confirmed by Ziehl–Neelsen staining and PCR amplification targeting the *RvD1Rv2031c* and *IS1081* loci, as described by Menin et al. (2013).

2.3.3 Expression, purification, and immunogenic evaluation of recombinant Mb1454-*M. bovis* protein

Mycobacterium bovis Mb1454 has been identified as a conserved homologue of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1419. Although the Mb1454 encoded product is an unknown protein, it shares 100 % identity with its counterpart in *M. tuberculosis* — a secreted 13 kDa ricin-like lectin from *M. tuberculosis* (sMTL-13) (Nogueira et al., 2010). *Mycobacterium tuberculosis* DNA used as a template for amplification of the Mb1454 gene was obtained from the virulent strain H37Rv and the nucleotide sequence was isolated through amplification using specific primers used to amplify the Rv1419 gene: forward (5'-GGAATTCCATATGGGTGAATTACGGTTGG-3') and, reverse (5'-CCGCTCGAGTCATTACGGCACGCTATCCC-3'). Amplification was performed using an initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 36 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, hybridization of the primers at 56°C for 1 min, extension of the primers at 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 10 min. The 474 bp product was inserted into the pGEM-T Easy cloning vector (Promega), subcloned into the pET-21a (+) expression vector (Novagen), and used to transform chemocompetent Arctic Express bacteria. Positive plasmid clones were grown in Luria-Bertani medium, cultures induced with 1 mM iso- propyl β -D-1-thiogalactopyranoside for 5 h. The recombinant protein was purified using a HisTrap FF 1 mL column (GE Healthcare Life Sciences) coupled to the ÄKTA avant 25 system (GE Healthcare Life Sciences) for purification through the histidine tail present in the recombinant protein. Fractions were concentrated and eluted in phosphate- buffered saline (PBS), followed by SDS-PAGE. Mb1454 protein was quantified using a Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific).

Recombinant protein expression was assessed using western blotting. After

electrophoretic separation in Tris-borate-EDTA buffer at 25 mA, the protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R- 250 solution and transferred to nitrocellulose membranes for 2 h at 25 V in transfer buffer. The transfer result was verified using Ponceau S dye, followed by incubation in a blocking solution containing 5 % skim milk for 1 h with shaking at a temperature of 25°C. The membrane was washed (Tris-buffered saline, TBS; 0.05 % Tween 20) and incubated with anti-Mb1454 monoclonal antibody (2 µg/mL) in a solution of TBS, 0.05 % Tween 20, and 5 % bovine serum albumin (BSA) for 16 h at 4°C with stirring. The protocol continued with the incubation of anti-mouse IgG secondary antibody, horseradish peroxidase (HRP)-linked (Cell Signaling Technology), diluted 1:2.000 in TBS solution, 0.05 % Tween 20, and 5 % skim milk. The membranes were developed using an ECL Kit (Pierce) and a ChemiDoc MP Photodocumenter (Bio-Rad).

Immunogenicity of the recombinant protein Mb1454 was evaluated by the ELISA method using murine samples (n = 4) collected pre- and post-immunization with Mb1454 (days 0, 7, and 21). ELISA reactivity was also assessed using hybridoma supernatants obtained from immunized mice, in addition to fetal bovine serum (FBS) and a purified anti- Mb1454 antibody, which served as controls.

2.3.4 Standardization of the ELISA assay using recombinant Mb1454 antigen

To standardize the indirect ELISA, at least six wells were reserved for negative control samples during the experiments on all plates. Sera were tested in duplicate, and the results were expressed as optical density (OD). Costar® 96-well high adsorption plates (Corning) were sensitized with different concentrations of the Mb1454 protein (0.1–1.0 µg) to determine the most appropriate concentration for use in the ELISA assay. The sera samples (bTB + and bTB) were diluted 200 and 400 times to obtain the best serological dilutions. Fetal bovine serum was used as a negative control. To prevent nonspecific binding, three blocking solutions were used: PBS + 1 % BSA + 3 % Milk + 0.05 % Tween (PBMT), PBS + 5 % BSA + 0.05 % Tween (PBT), and PBS + 5 % Milk + 0.05 % Tween (PMT). This was followed by the evaluation of 1:1.000, 1:5.000, and 1:10.000 dilutions of the HRP-conjugated anti- bovine IgG immunoglobulin conjugated secondary antibody (Sigma- Aldrich). The plate was kept in an oven at 37°C during the incubation. The reaction was developed with tetramethylbenzidine (TMB; Thermo Fisher Scientific) for more than 7 min at 25°C in a shelter protected from light. The reaction was stopped by adding 1 N hydrochloric acid (HCl), and the plate was read using

a Bio-Tek Instruments microplate reader (Thermo Fisher Scientific) at a wavelength of 450 nm. The incubation stages of the experiment were conducted in a controlled environment at 22–24°C.

2.3.5 IDEXX *M. bovis* antibody ELISA test

The IDEXX *M. bovis* Ab test® (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) is a commercially available kit for detecting antibodies against *M. tuberculosis* complex antigens MPB70 and MPB83, using a 96-well microtiter plate format. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, serum samples were diluted 1:50 in PBS and tested in duplicate. One hundred microliters of the reagent were added to the wells in duplicate, incubated for 60 min, and washed six times. The positive and negative test control reagents of the assay were used to validate each microtiter plate and provide data to calculate the test results. The test results were interpreted according to the manufacturer's instructions.

2.3.6 Post-mortem examination and pathological analysis

All cattle classified as bTB-positive were examined postmortem at federally inspected abattoirs in compliance with Brazilian sanitary regulations and international biosafety standards. During necropsy, all organs and lymph nodes were systematically examined for the presence of gross lesions suggestive of bovine tuberculosis (bTB). Organs and lymph nodes were transversely sectioned at 0.5–1.0 cm intervals and examined individually. Tissue samples with and without visible lesions were aseptically collected for *M. bovis* culture, PCR detection, and histopathological analysis. Only animals whose tissues tested positive for *M. bovis* by at least one of these methods were included in the study. Tissue fragments were fixed in 10 % neutral-buffered formalin and dehydrated through a graded ethanol series. After dehydration, samples were embedded in paraffin, sectioned at 4 µm, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological evaluation and with Ziehl–Neelsen for detection of acid-fast bacilli (AFB). Microscopically, granulomas from lymph nodes and major organs/tissues (pericardium, pleura, liver, spleen, intestines, mesentery, uterus, ovaries, kidneys, urinary bladder, adrenal glands, and skeletal muscle) were classified into four severity stages according to Menin et al. (2013): stage I - initial or early lesions; stage II - solid granulomas; stage III - minimal necrosis; or stage IV - necrosis and mineralization.

Additionally, three levels of granuloma encapsulation were identified following classification being proposed in this study: level I - thin encapsulation; level II - dense fibrous capsule; level III - thickly fibrous encapsulation. The correlation between anti-*M. bovis* antibody levels and the different stages of lesion development were determined by the indirect ELISA-Mb1454 and IDEXX *M. bovis* Ab test.

2.3.7 Statistical analyses

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.4.2, 2020 (GraphPad Software Inc.). Differences between groups were assessed using the nonparametric Mann–Whitney test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Multivariate principal component analysis (PCA) was performed using Statistical version 8.0, 2007 data analysis software. To obtain the receiver operating characteristic (ROC) curve, MedCalc Software version 22.023, 2023 was used with index values for positive and negative samples. The diagnostic performance was evaluated by estimating the sensitivity, specificity, and area under the ROC curve (AUC).

2.4 Results

2.4.1 Evaluation of the expression and immunogenicity of the Mb1454 protein

The recombinant Mb1454 protein was successfully expressed and purified using a specific anti-Mb1454 monoclonal antibody. The target gene encodes a 157-amino-acid protein with a predicted SEC-type signal peptide and an estimated molecular mass of approximately 16.8 kDa, consistent with the band observed on SDS-PAGE and immunoblot (Fig. 2.1A). The immunogenicity of Mb1454 was confirmed by ELISA in sera from C57BL/6 mice immunized with the recombinant protein. A marked increase in anti-Mb1454 IgG levels was detected at both 7 and 21 days post-immunization compared to pre-immune sera (0), indicating a robust antigen-specific humoral response (Fig. 2.1B). Additionally, analysis of hybridoma supernatants derived from immunized mice identified clones producing antibodies specifically reactive to Mb1454, confirming the feasibility of generating monoclonal antibodies against this antigen. The reactivity profile of the purified anti-Mb1454 antibody demonstrated strong and specific binding to the recombinant protein (Fig. 2.1B, $p < 0.0001$),

further supporting its potential utility in immunodiagnostic assays such as ELISA for bovine tuberculosis.

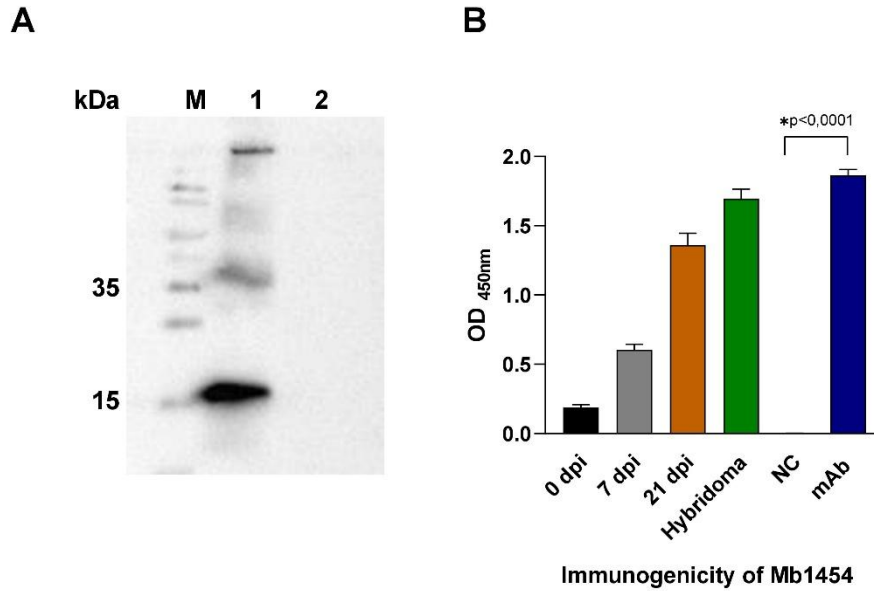


Figure 2.1 Identification of Mb1454 protein. Purified anti-Mb1454 monoclonal antibody (2 µg/mL) was used, followed by incubation with anti-mouse IgG (1:2,000) and detection of a band with a molecular mass of ~17 kilodaltons (kDa) corresponding to the Mb1454 protein (1). White denotes saline solution + sample (2) and molecular maker (M) (A). Examination of the antigenic and immunogenic properties of recombinant Mb1454 protein. ELISA showing the kinetics of Mb1454-specific IgG titers post immunization of C57BL/6 mice (n = 4). Serum samples were collected on days 0, 7, and 21 post immunization (dpi); hybridoma derived from mice immunized with Mb1454 containing anti- Mb1454 monoclonal antibody; fetal bovine serum was considered negative control (NC); and reactivity of purified anti-Mb1454 antibody (mAb) (B). Mean optical density (OD) $\pm$ SEM.

2.4.2 Optimization of ELISA-Mb1454

Different concentrations of the purified recombinant Mb1454 protein (0.1, 0.3, 0.5, and 1.0 µg) and serum dilutions of 1:200 and 1:400 were evaluated. The enzyme-substrate reaction was developed for 15 min. The condition using 0.5 µg of Mb1454 with a 1:200 serum dilution yielded the highest absorbance values and provided a clear distinction between bTB-positive (bTB+) and bTB-negative (bTB-) serum samples (Fig. 2.2A).

Three different blocking solutions were evaluated for their ability to reduce nonspecific

binding while preserving specific antigen–antibody interactions: PBS + 1 % BSA + 3 % milk + 0.05 % Tween-20 (PBMT), PBS + 5 % BSA + 0.05 % Tween-20 (PBT), and PBS + 5 % milk + 0.05 % Tween-20 (PMT) (Fig. 2.2B). Notable differences in background signal and discriminatory capacity were observed among the formulations. The PMT solution resulted in high background absorbance in bTB-negative (bTB-) samples, likely due to excessive protein deposition from the higher milk concentration, which compromised signal-to-noise ratio (Fig. 2.2B). In contrast, both PBMT and PBT provided lower background levels, with PBMT showing superior performance by maximizing the signal from bTB-positive (bTB+) samples while minimizing nonspecific reactivity in bTB controls (Fig. 2.2B). Based on these results, PBMT was selected as the optimal blocking solution for subsequent ELISA-Mb1454 assays. To determine the optimal dilution of the secondary antibody, three dilutions of conjugated anti-bovine IgG immunoglobulin were tested (1:1.000, 1:5.000, and 1:10.000) (Fig. 2.2C). Differences were observed in the detection of anti-*M. bovis* antibodies and separation of the bTB+ (n = 113) and bTB- (n = 120) groups. The 1:1.000 dilution of the secondary antibody showed superior performance (Fig. 2.2C), with the highest signal and the lowest background signal, better separating the bTB+ from the bTB- sample group. Thus, the optimal parameters for detection and separation of bTB+ and bTB- sera for the ELISA-Mb1454 test were determined to be a plate-sensitizing concentration of 0.5 µg of recombinant Mb1454 protein, PBMT blocking solution, 1:200 dilution of sera, 1:1.000 dilution of secondary antibody, 1 h incubation time of the blocking stage at 37°C, and > 15 min development time of the enzyme-substrate reaction.

After standardization, the diagnostic performance of ELISA-Mb1454 was compared to that of the commercial IDEXX *M. bovis* Ab test using sera from bTB-positive (n = 113) and bTB-negative (n = 120) cattle. The ELISA-Mb1454 effectively differentiated between bTB+ and bTB- samples, exhibiting significantly higher optical density (OD) values in the bTB+ group ($p < 0.0001$). Moreover, ELISA-Mb1454 detected several bTB+ samples that tested negative in the IDEXX assay (Fig. 2.3).

Analytical specificity was further evaluated using sera from animals infected with endemic pathogens—including BoAHV-1, BoAHV-5, BVDV, *Neospora caninum*, *Brucella abortus*, and *Leptospira* sp. No cross-reactivity was observed, confirming the high specificity of the ELISA-Mb1454 assay (Fig. 2.3A).

Serological analysis of 233 bovine serum samples using the ELISA-Mb1454 revealed excellent diagnostic performance. The assay achieved a sensitivity of 92.9 % and a specificity of 90.0 %, based on the optimal cutoff value determined by the receiver operating characteristic

(ROC) curve (Fig. 2.3B; Table 2.1). The area under the ROC curve (AUC) was 0.969 (95 % CI: 0.938–0.987; $p < 0.0001$), indicating a high ability to discriminate between bTB-positive and bTB-negative animals. Compared to the commercial IDEXX *M. bovis* Ab test, the difference in AUCs between the two tests was statistically significant (AUC = 0.279).

Table 2.1 Performance of the ELISA-Mb1454 and IDEXX *M. bovis* Ab test (IDEXX Ab test).

	AUC (95% CI)	SEN	SPE	ACC	Criterion	Difference between areas
Different models						0,279
ELISA-Mb1454	0,969 (0,938–0,987)	92,9	90,0	91,37	>0,217	
IDEXX Ab test	0,690 (0,626–0, 749)	53,1	82,5	68,2	>0,30	

AUC = Area under the curve; SEN = Sensitivity; SPE = Specificity; ACC = Accuracy. $P < 0,0001$ (95% confidence interval (CI)).

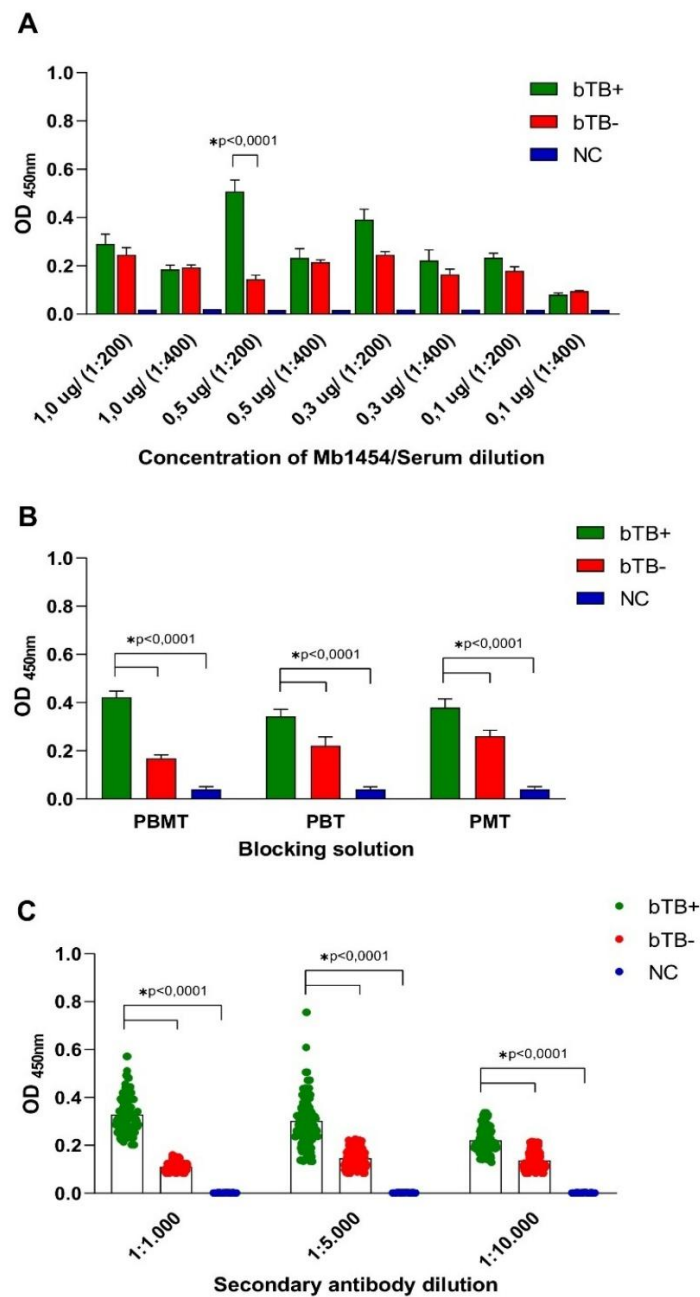


Figure 2.2 ELISA-Mb1454 standardization. Initially, different concentrations of Mb1454 protein (0.1–1 µg) were tested for sensitization of the polystyrene plate. Bovine serum samples were diluted 1:200 and 1:400 (bTB+; n = 10) (bTB-; n = 10) (A). To choose the blocking, the performance of three solutions was evaluated: PBS + 1 % BSA + 3 % Milk + 0.05 % Tween (PBMT), PBS + 5 % BSA + 0.05 % Tween (PBT) and PBS + 5 % Milk + 0.05 % Tween (PMT) (bTB+; n = 113) (bTB-; n = 120) (B). Finally, dilutions of peroxidase- conjugated anti-bovine IgG secondary antibody were tested: 1:1.000, 1:5.000, and 1:10.000 (bTB+; n = 113) (bTB-; n = 120). Fetal bovine serum was used as a negative control (NC) (C). The results are presented as mean OD ± SEM.

These findings highlight the robustness of ELISA-Mb1454 as a reliable serological tool for the detection of *M. bovis* infection in cattle.

Of the 113 bTB+ samples, 105 showed antibody titers above the cutoff point, demonstrating test positivity (Table 2.2). Thus, the ELISA- Mb1454 was able to detect bTB+ samples that were not detected by the IDEXX *M. bovis* Ab antibody test (false negatives). At this point, the positive samples contributed to a high specificity of 90.0 %. The ELISA-Mb1454 achieved an accuracy of 91.37 % (Table 2.1). In contrast, the IDEXX antibody test had a sensitivity and specificity of 53.1 % and 82.5 %, respectively, with an accuracy of 68.2 % (Table 2.1). When compared, the diagnostic performance of the ELISA-Mb1454 was 23 % superior to that of the commercial IDEXX *M. bovis* antibody test (Fig. 2.3C).

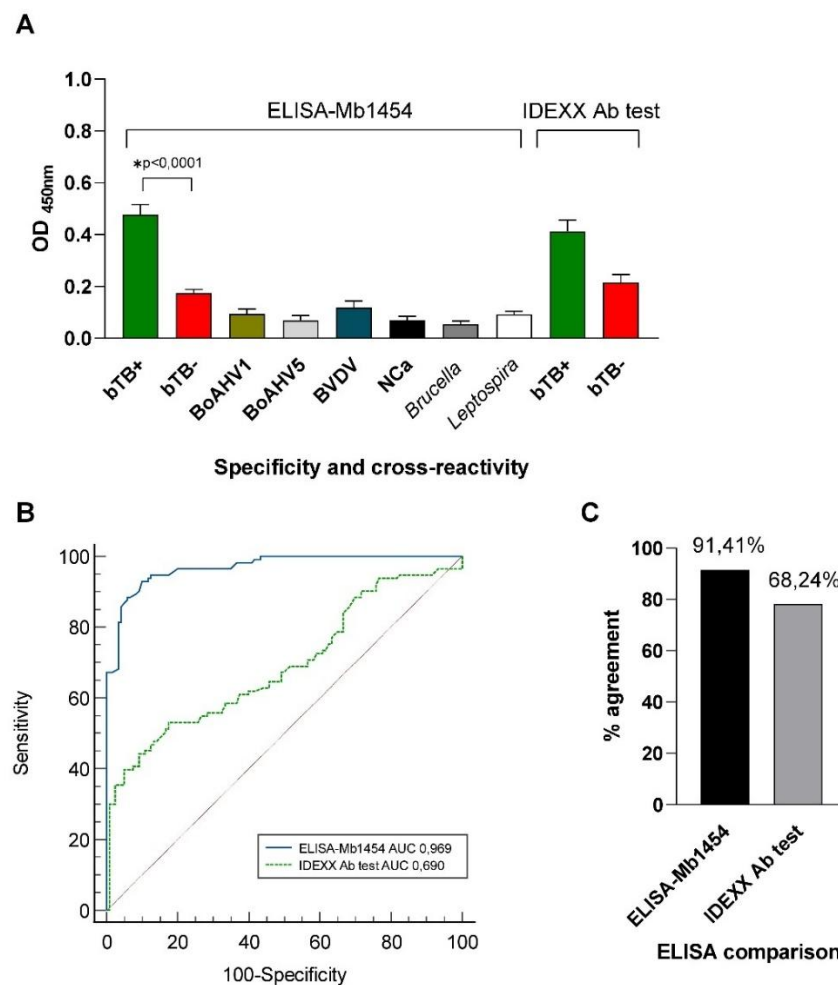


Figure 2.3 Diagnostic performance of ELISA-Mb1454 and IDEXX *M. bovis* Ab test (IDEXX Ab test). Detection of anti-Mb1454 and anti-MPB70/MPB83 humoral immune responses by ELISA-Mb1454 and ELISA IDEXX Ab

test (bTB+; n = 113) (bTB-; n = 120). Analytical specificity and occurrence of cross- reactions for ELISA-Mb1454 tested in: Alpha herpesvirus 1 (BoAHV1) (n = 15), BoAHV5 (n = 15), bovine viral diarrhea virus (BVDV) (n = 15), *Neospora caninum* (NCa) (n = 15), *Brucella abortus* (n = 15), and *Leptospira sp.* (n = 15). Results shown are mean OD $\pm$ SEM (A). Comparison of the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve obtained for ELISA-Mb1454 and the IDEXX *M. bovis* Ab test. ELISA-Mb1454: sensitivity 92.9 %; specificity 90.0 %; (AUC: 0.96 %, confidence interval 0.93–0.98; $p < 0.0001$). IDEXX Ab test: sensitivity: 53.1 %; specificity 82.5 % (AUC: 0.69 %, confidence interval 0.62–0.74; $p < 0.0001$). Data were plotted using MedCalc software version 22.023, 2023 (B). Percentage of diagnostic agreement between anti-Mb1454 and anti-MPB70/MPB83 humoral immune response by antibody detection using ELISA test and intradermal comparative cervical tuberculin test (SICTT)/ isolation of *Mycobacterium bovis* by bacterial culture (n = 233) (C).

Table 2.2 Confusion matrix for ELISA-Mb1454.

	Positive	Negative	Total
Test Positive	True Positives (TP): 105	False Positives (FP): 12	117
Test Negative	False Negatives (FN): 8	True Negatives (TN): 108	116
Total	113	120	233

Sensitivity (TP/TP+FN*100), 92,9%; Specificity (TN/TN+FP*100), 90,0%.

2.4.3 Correlation between levels of anti-*M. bovis* antibodies and histopathological staging of bTB lesions using ELISA-Mb1454 and IDEXX *M. bovis* Ab test

The correlation between the severity stage determined by bTB and the IgG response has not been reported in any previous study. To better understand this situation, multivariate statistics were used to detail the relationship between the amount of anti-Mb145 and anti-MPB70/MPB83 antibodies and the histopathological staging of the lesions. Principal component 1 (PCA1) explained 55.11 % of the variation, whereas principal component 2 (PCA2) explained 44.89 %. The mean scores of PC1 and PC2 were not significantly associated with the antibody titer by lesion staging (Fig. 2.4), suggesting that there is no correlation between the histopathological stage of bTB lesions and the amount of anti-Mb145 and anti-MPB70/MPB83 IgG antibodies circulating in the peripheral blood. It is important to highlight that, in this study, the groups of bovine sera evaluated demonstrated histopathological predominance of stages 3 and 2 and the difference between the serological tests used may have contributed to the capture of different aspects of the immune response.

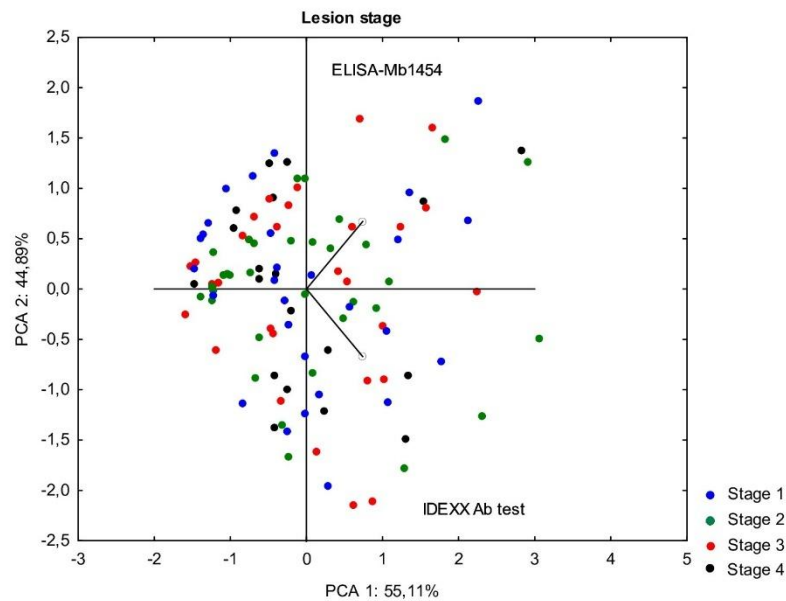


Figure 2.4 Principal component analysis (PCA) between the development stage of the bovine tuberculosis lesion and the amount of IgG antibodies by ELISA- Mb1454 and IDEXX *M. bovis* Ab test (IDEXX Ab test). Serum samples analyzed were obtained from cattle classified into four stages of bovine tuberculosis (bTB) lesion development: Stage 1 – initial or early granulomatous lesions (n = 28); Stage 2 – well-formed solid granulomas (n = 35); Stage 3 – granulomas with minimal central necrosis (n = 30); and Stage 4 – advanced granulomas exhibiting central necrosis and dystrophic mineralization (n = 20). The data are organized in a biplot. Principal components 1 (PCA1) and 2 (PCA2) represent 100 % of the variety of the data. Data are plotted using Statistica Software, version 8.0, 2007.

2.5 Discussion

The development of a diagnostic test for the detection of *M. bovis* has posed challenges, with several research groups seeking to express anti genes for use in the diagnosis of bovine tuberculosis (bTB) (Moens et al., 2023; Villafañe et al., 2024; Waters et al., 2011). Obtaining an immunogenic protein capable of being used in a low-cost serological assay is necessary to reduce bTB transmission rates. The present study describes the development of an ELISA based on the Mb1454 antigen, developed and validated to detect the presence of anti-*M. bovis* antibodies in bovine serum samples. The assay is repeatable, reproducible, and specific, suggesting its value as a diagnostic strategy for bTB.

To date, serological tests are predominantly based on the MPB70 and MPB83 antigens, considered the main and most studied mycobacterial antigens (Wiker, 2009), used in the detection of specific antibodies by the IDEXX *M. bovis* Ab test. There are no differences between *M. bovis* and *M. tuberculosis* in the sequences of the expressed proteins encoded by

the mpb70/mbt70 and mpb83/mbt83 genes (Hewinson et al., 1996; Matsuo et al., 1996). Similarly, the Mb1454 protein is homologous to the secreted 13 kDa ricin-like lectin from *M. tuberculosis* (sMTL-13), with an approximate molecular weight of 16.8 kDa (Nogueira et al., 2010), as demonstrated after its expression and purification (Fig. 2.1A). Evaluation of the antigenicity of the Mb1454 protein using sera from C57BL/6 mice immunized with Mb1454 demonstrated a marked increase in anti-Mb1454 IgG levels 7 and 21 days post immunization, compared to day 0 (pre-immune serum), indicating a robust antigen-specific humoral response (Fig. 2.1B). In a study by Nogueira et al. (2010), the Mb1454 homologous antigen (sMTL-13) showed high antigenicity and the ability to induce antibody production, making Mb1454 a promising antigen for detecting anti-*M. bovis* antibodies in serodiagnostic tests. In contrast, another study (Moens et al., 2023) did not obtain the expected reactivity to Mb1454 in sera from four infected cattle during the evaluation of the immunogenicity of candidate proteins for inclusion in the Luminex-bTB assay. However, it is important to note that the study involved a small sample and animals from a different geographic region, possibly raised under different management and environmental conditions, which may have influenced the immune response to this specific antigen.

Performance analysis of the ELISA developed with the Mb1454 protein showed a sensitivity of 92.9 % and a specificity of 90.0 %, indicating a high capacity to discriminate between bovine tuberculosis- positive and -negative sera, as confirmed by the area under the receiver operating characteristic curve (AUC-ROC) of 0.96 (95 % coefficient of variation; confidence interval 0.93–0.98; $p < 0.0001$) (Fig. 2.3B). Tests with AUC values between 0.7 and 0.8 have a high capacity to differentiate between infected and uninfected individuals (Mandrekar, 2010; Zhao et al., 2017). In comparison, in this evaluation, the IDEXX *M. bovis* Ab test obtained sensitivity and specificity values of 53.1 % and 82.5 %, respectively (Table 2.1), with an AUC of 0.69. According to its developers, these values are approximately 63 % for sensitivity and 98 % for specificity (Waters et al., 2011). For experimental confirmation, the ELISA-Mb1454 demonstrated high immunoanalytical specificity, showing no cross-reactivity with common bovine pathogens tested (Fig. 2.3A), such as bovine alphaherpesvirus 1 (BoAHV-1), bovine alphaherpesvirus 5 (BoAHV-5), bovine viral diarrhea virus (BVDV), *Neospora caninum*, *Brucella abortus*, and *Leptospira sp.* This suggests that the Mb1454 antigen may be genus-specific. Antigens with high cross-reactivity lead to false-positive results, reducing the specificity of the immunoassay (Wang et al., 2023).

Furthermore, the ELISA-Mb1454 significantly reduced the occurrence of false negatives in animals not detected by the IDEXX *M. bovis* Ab test, achieving an accuracy of 91

%. In contrast, the accuracy of the IDEXX *M. bovis* Ab test was 68.2 % (Table 2.1), indicating an approximately 23 % higher diagnostic performance for the Mb1454 ELISA (Fig. 2.3C). The reduction in false negatives and positives is related to the increased sensitivity and specificity of the method (Khalid et al., 2023). However, developing a test with 100 % accuracy is challenging due to the presence of multiple interfering factors (Elnaggar et al., 2017; Khalid et al., 2023), including host anergy, immunosuppression, and cross-reactive immune responses triggered by exposure to or infection with other microorganisms (Karuppusamy et al., 2019; Waters et al., 2011). Individual and population factors, such as breed-specific immune responsiveness, regional differences in disease prevalence, herd management practices, nutritional status, and environmental stressors, can also modulate the humoral immune response to *M. bovis*.

These results, combined with histopathological analysis, enabled us to establish a correlation between the severity of bTB lesions and the IgG response detected by the ELISA-Mb1454 and IDEXX *M. bovis* Ab test. For anti-Mb1454 humoral response and anti-MPB70/MPB83 humoral response, the mean scores obtained for PC1 and PC2 were not significantly associated with antibody titer by lesion stage (Fig. 2.4). These data suggest the absence of a proportional relationship between the amount of circulating antibodies in peripheral blood and the presence of more severe histopathological lesions caused by bTB. Similar findings were observed during *M. tuberculosis* infection in humans, in which disease severity did not affect the IgG response. Furthermore, asymptomatic individuals presented low levels of antibodies against *M. tuberculosis* antigens (Dewi et al., 2023). Another study (Niki et al., 2015) indicated that there is no relationship between IgG levels as an immunological marker and the severity of tuberculosis in humans. In contrast, individuals with active tuberculosis often present high antibody levels (Osada-Oka et al., 2013; Simonney et al., 2007). Due to the structural pattern of the granulomatous response, cattle with lesions in advanced stages (3 and 4) have a reduced mycobacterial load (Larenas-Muñoz et al., 2022; Menin et al., 2013), which may interfere with the humoral immune response. Therefore, the relationship between the number of antibodies and the severity of bTB lesions is complex and not always straightforward. IgG antibodies detected at higher levels may be associated with active disease. However, according to our observations, the number of antibodies is not a sole indicator of the immune response against bovine tuberculosis, and other factors must be considered, necessitating further studies.

To date, the use of serological tests for the diagnosis of bovine tuberculosis has remained limited, particularly in Brazil, where the SICTT continues to be the primary diagnostic method

employed in control programs. Moreover, the combined use of the ELISA-Mb1454 and Bovigam IFN- γ assays could improve the overall sensitivity of bTB diagnosis, particularly in anergic animals. The development of a low- cost, sensitive, and specific national assay suitable for large-scale application could substantially reduce the impact of bTB by decreasing dependence on indirect diagnostic methods and preventing the unnecessary culling of false-positive animals (Moyano et al., 2021). In this context, the ELISA-Mb1454, developed using the recombinant Mb1454 antigen, demonstrated high sensitivity, specificity, and analytically reliability for the serological detection of *M. bovis* infection in cattle. Nonetheless, it is important to acknowledge that humoral immune responses to *M. bovis* can be influenced by multiple factors, including genetic variability among cattle breeds, environmental conditions, regional pathogen exposure, and herd management practices. Such variables may affect antibody production, alter test sensitivity or specificity, and consequently impact diagnostic consistency under field conditions. Therefore, although the present results are promising, further validation studies encompassing a broader range of cattle breeds, geographic locations, and production systems are essential to confirm the reliability, reproducibility, and field applicability of the ELISA-Mb1454 across diverse epidemiological contexts.

2.6 CRediT authorship contribution statement

Bueno Natana M. M.: Writing – review & editing, Validation, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. Álvaro Menin: Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. Lucas L. Nogueira: Writing – review & editing, Methodology, Formal analysis, Data curation. Aginaldo R. Pinto: Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. Carolina Reck: Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Methodology.

2.7 Funding

This study was partially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (Finance Code 001). Declaration of Competing Interest The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

2.8 Acknowledgements

The authors would like to thank Professor André Báfica of the Immunobiology Laboratory of the University of Santa Catarina for his contributions.

2.9 References

- Menin, Á., Fleith, R., Reck, C., Marlow, M., Fernandes, P., Pilati, C., Báfica, A., 2013. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PLoS One* 8, e53884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053884>.
- Byrne, A.W., Barrett, D., Breslin, P., Fanning, J., Casey, M., Madden, J.M., Lesellier, S., Gormley, E., 2022. Bovine tuberculosis in youngstock cattle: narrative review. *Front. Vet. Sci.* 9, 1000124. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1000124>.
- Casal, C., Infantes, J.A., Risalde, M.A., Díez-Guerrier, A., Domínguez, M., Moreno, I., Romero, B., de Juan, L., Sáez, J.L., Juste, R., Gortázar, C., Domínguez, L., Bezós, J., 2017. Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. *Res. Vet. Sci.* 112, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.012>.
- Moens, C., Filée, P., Boes, A., Alie, C., Dufrasne, F., André, E., Marché, S., Fretin, D., 2023. Identification of new *Mycobacterium bovis* antigens and development of a multiplexed serological bead-immunoassay for the diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *PLoS One* 18, e0292590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292590>.
- Dewi, D.N.S.S., Mertaniasih, N.M., Soedarsono, Hagino, K., Yamazaki, T., Ozeki, Y., Artama, W.T., Kobayashi, H., Inouchi, E., Yoshida, Y., Ishikawa, S., Shaban, A.K., Tateishi, Y., Nishiyama, A., Ato, M., Matsumoto, S., 2023. Antibodies against native proteins of *Mycobacterium tuberculosis* can detect pulmonary tuberculosis patients. *Sci. Rep.* 13, 12685. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39436-4>.
- Larenas-Muñoz, F., Sánchez-Carvajal, J.M., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Vera-

- Salmoral, E., Gómez-Gascón, L., Maldonado, A., Carrasco, L., Tarradas, C., Luque, I., Rodríguez-Gómez, I.M., Gómez-Laguna, J., 2022. The role of histopathology as a complementary diagnostic tool in the monitoring of bovine tuberculosis. *Front. Vet. Sci.* 9, 816190. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.816190>.
- Ameni, G., Vordermeier, M., Firdessa, R., Aseffa, A., Hewinson, G., Gordon, S.V., Berg, S., 2011. *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. *Vet. J.* 188, 359–361. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.005>.
- Romha, G., Gebru, G., Asefa, A., Mamo, G., 2018. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in animals: Transmission dynamics and control challenges of zoonotic TB in Ethiopia. *Prev. Vet. Med.* 158, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.06.012>.
- Khalid, H., Pierneef, L., van Hooij, A., Zhou, Z., de Jong, D., Tjon Kon Fat, E., Connelley, T.K., Hope, J.C., Corstjens, P.L.A.M., Geluk, A., 2023. Development of lateral flow assays to detect host proteins in cattle for improved diagnosis of bovine tuberculosis. *Front. Vet. Sci.* 10, 1193332. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1193332>.
- Wiker, H.G., 2009. MPB70 and MPB83—Major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scand. J. Immunol.* 69, 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02256.x>.
- Fielding, H.R., McKinley, T.J., Delahay, R.J., Silk, M.J., McDonald, R.A., 2021. Characterization of potential superspreader farms for bovine tuberculosis: A review. *Vet. Med. Sci.* 7, 310–321. <https://doi.org/10.1002/vms3.358>.
- Zhao, J., Shiratori, B., Okumura, M., Yanai, H., Matsumoto, M., Nakajima, C., Mizuno, K., Ono, K., Oda, T., Chagan-Yasutan, H., Ashino, Y., Matsuba, T., Yoshiyama, T., Suzuki, Y., Hattori, T., 2017. Difference in antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Japanese tuberculosis patients infected with the Beijing/non-Beijing genotype. *J. Immunol. Res.* 2017, 4797856. <https://doi.org/10.1155/2017/4797856>.

- Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 163, 115–127. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0655>.
- Mandrekar, J.N., 2010. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J. Thorac. Oncol.* 5, 1315–1316. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>.
- McCallan, L., Brooks, C., Barry, C., Couzens, C., Young, F.J., McNair, J., Byrne, A.W., 2021. Serological test performance for bovine tuberculosis in cattle from herds with evidence of on-going infection in Northern Ireland. *PLoS One* 16, e0245655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245655>.
- Nogueira, L., Cardoso, F.C., Mattos, A.M., Bordignon, J., Figueiredo, C.P., Dahlstrom, P., Frota, C.C., Duarte Dos Santos, C.N., Chalhoub, M., Cavada, B.S., Teixeira, H.C., Oliveira, S.C., Barral-Netto, M., Báfica, A., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* 40, 744–753. <https://doi.org/10.1002/eji.200939747>.
- Villafañe, L., Rocha, R.V., Bigi, M.M., Klepp, L.I., Taboga, O.A., Forrellad, M.A., López, M.G., Bigi, F., 2024. Expression and field evaluation of new *Mycobacterium bovis* antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 273, 110788. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2024.110788>.
- Britton, L.E., Cassidy, J.P., O'Donovan, J., Gordon, S.V., Markey, B., 2016. Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis). *Vet. J.* 209, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.033>.
- Klepp, L.I., Eirin, M.E., Garbaccio, S., Soria, M., Bigi, F., Blanco, F.C., 2019. Identification of bovine tuberculosis biomarkers to detect tuberculin skin test and IFN γ release assay false negative cattle. *Res. Vet. Sci.* 122, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.016>.

- Dametto, L.L., Santos, E.D.Dos, Santos, L.R., Dickel, E.L., 2020. Bovine tuberculosis: Diagnosis in dairy cattle through the association of analyzes. *Pesq. Vet. Bras.* 40, 12–16. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6294>.
- Niki, M., Suzukawa, M., Akashi, S., Nagai, H., Ohta, K., Inoue, M., Niki, M., Kaneko, Y., Morimoto, K., Kurashima, A., Kitada, S., Matsumoto, S., Suzuki, K., Hoshino, Y., 2015. Evaluation of humoral immunity to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens for correlation with clinical status and effective vaccine development. *J. Immunol. Res.* 2015, 527395. <https://doi.org/10.1155/2015/527395>.
- Osada-Oka, M., Tateishi, Y., Hirayama, Y., Ozeki, Y., Niki, M., Kitada, S., Maekura, R., Tsujimura, K., Koide, Y., Ohara, N., Yamamoto, T., Kobayashi, K., Matsumoto, S., 2013. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. *Microbiol. Immunol.* 57, 30–37. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.12005.x>.
- Eirin, M.E., Macias, A., Magnano, G., Morsella, C., Mendez, L., Blanco, F.C., Bianco, M.V., Severina, W., Alito, A., Pando, M.L.A., Singh, M., Spallek, R., Paolicchi, F.A., Bigi, F., Cataldi, A.A., 2015. Identification and evaluation of new *Mycobacterium bovis* antigens in the in vitro interferon gamma release assay for bovine tuberculosis diagnosis. *Tuberc. (Edinb.)* 95, 795–801. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.07.009>.
- Elnaggar, M.M., Abdellrazeq, G.S., Elsisy, A., Mahmoud, A.H., Shyboub, A., Sester, M., Khaliel, S.A., Singh, M., Torky, H.A., Davis, W.C., 2017. Evaluation of antigen specific interleukin-1 β as a biomarker to detect cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Tuberc. (Edinb.)* 105, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.04.009>.
- MAPA—Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), Mapa/SDA/DIA, Brasília, 2006, p. 188.
- Simonney, N., Chavanet, P., Perronne, C., Leportier, M., Revol, F., Herrmann, J.L., Lagrange, P.H., 2007. B-cell immune responses in HIV positive and HIV negative patients with tuberculosis evaluated with an ELISA using a glycolipid antigen. *Tuberc.*

(Edinb.) 87, 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.05.005>.

Sweetline Anne, N., Ronald, B.S., Kumar, T.M.A.S., Kannan, A., Thangavelu, A., 2017. Molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis* in cattle. *Vet. Microbiol* 198, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.013>.

Sweetline Anne, N., Ronald, B.S.M., Senthil Kumar, T.M.A., Thangavelu, A., 2019. Conventional and molecular determination of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* isolates in cattle. *Tuberc. (Edinb.)* 114, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.005>.

Moyano, R.D., Romero, M.A., Colombatti Olivieri, M.A., Alvarado Pinedo, M.F., Traveria, G.E., Romano, M.I., Alonso, M.N., 2021. Development and validation of a novel ELISA for the specific detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis based on a chimeric polyprotein. *Vet. Med. Int.* 2021, 7336848. <https://doi.org/10.1155/2021/7336848>.

Hewinson, R.G., Michell, S.L., Russell, W.P., McAdam, R.A., Jacobs Jr, W.R., 1996. Molecular characterization of MPT83: A seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand. J. Immunol.* 43, 490–499. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1996.d01-78.x>.

Karuppusamy, S., Kirby, G.M., Mutharia, L., Tripathi, B.N., 2019. An update on *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis antigens and their role in the diagnosis of Johne's disease. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 120. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2691-0>.

Matsuo, T., Matsuo, H., Ohara, N., Matsumoto, S., Kitaura, H., Mizuno, A., Yamada, T., 1996. Cloning and sequencing of an MPB70 homologue corresponding to MPB83 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand. J. Immunol.* 43, 483–489. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1996.d01-68.x>.

The World Organization for Animal Health (OIE), Bovine tuberculosis, <http://>

www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BOVINE-TB-EN.pdf}. 2020.

The World Organization for Animal Health (OIE), The Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Bovine Tuberculosis, WAHID, Paris, 2011, p. 590.

Waters, W.R., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., Gormley, E., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Linscott, R., Martel, E., Milian, F., Foshaug, W., Lawrence, J.C., 2011. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Vaccin. Immunol.* 18, 1882–1888. <https://doi.org/10.1128/CVI.05343-11>.

Li, X., Xia, A., Xu, Z., Liu, J., Fu, S., Cao, Z., Shen, Y., Xie, Y., Meng, C., Chen, X., Jiao, X., 2022. Development and evaluation of a *Mycobacterium bovis* interferon- γ enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay for detection of bovine tuberculosis. *J. Dairy Sci.* 105, 6021–6029. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21301>.

Zhu, X., Wang, J., Zhao, Y., Zhang, Z., Yan, L., Xue, Y., Chen, Y., Robertson, I.D., Guo, A., Aleri, J., 2023. Prevalence, distribution, and risk factors of bovine tuberculosis in dairy cattle in central China. *Prev. Vet. Med.* 213, 105887. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105887>.

Wang, Y., Li, Q., Liang, G., Li, H., Li, Z., Gao, T., Song, L., Huang, X., Peng, D., Zhang, X., 2023. Preparation of a highly specific and sensitive monoclonal antibody against tilmicosin and its application in lateral flow immunoassay. *One Health Adv.* 1. <https://doi.org/10.1186/s44280-023-00032-w>.

CAPÍTULO 3

BLV coinfection impairs immunity and diagnostics in bovine tuberculosis

Publicado em:

MENIN, Á.; BUENO, N.M.M.; HINDLMAYER, M.E.; RECK, C.; DE LIMA NOGUEIRA, L.; PINTO, A.R.; BÁFICA, A. BLV coinfection impairs immunity and diagnostics in bovine tuberculosis. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 30286, 2025. doi: 10.1038/s41598-025-13121-0.

3.1 Abstract

Coinfections can alter the adaptive immune responses to bovine tuberculosis (bTB) and hinder accurate diagnosis; however, their effect on host immunity to *Mycobacterium bovis* and disease progression is not well understood. In this study, we assessed the impact of natural coinfection with bovine leukemia virus (BLV) on immune responses to *M. bovis*. Among 108 cattle examined, those coinfecting with BLV showed a significantly higher intragranulomatous mycobacterial burden and more severe pathological lesions compared to animals infected with *M. bovis* alone. Additionally, coinfecting animals demonstrated a granulomatous response characterized by reduced lymphocyte populations, increased neutrophil infiltration, and diminished granuloma encapsulation, suggesting a compromised antimycobacterial immune response. Supporting this hypothesis, BLV-infected cattle exposed to mycobacterial antigens displayed impaired delayed-type hypersensitivity (type IV hypersensitivity) to a purified protein derivative of *M. bovis* as well as reduced antibody response. These findings indicate that BLV coinfection influences the immunopathogenesis of bTB, exacerbates disease progression in cattle naturally infected with *M. bovis*, and may reduce the predictive reliability of diagnostic methods used in bTB control programs.

3.2 Introduction

Mycobacterium bovis, an intracellular acid-fast bacillus, is the primary causative agent of bovine tuberculosis (bTB), a zoonotic disease with significant global economic impacts¹. Despite eradication programs based on diagnostic testing and culling, bTB persists, infecting an estimated 50 million cattle worldwide and causing annual economic losses of approximately US \$3 billion². The single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICCT), which assesses delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative (PPD) tuberculin, remains the primary diagnostic method³. Additionally, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based tests to detect antibodies against *M. bovis* proteins (MPB70, MPB83, ESAT-6, and CFP-10) have been used as a diagnostic strategy in some countries^{4,5}. However, their sensitivity and specificity are influenced by disease progression and immunomodulation owing to coinfections⁶. For instance, *Fasciola hepatica* coinfection in bTB- positive cattle reduces reactivity in the tuberculin test⁷.

We previously characterized the granulomatous response in bovines during natural *M.*

bovis infection⁸. Specifically, we examined tissue immune responses in 228 dairy cattle infected solely with *M. bovis*. However, in subsequent cohorts of asymptomatic animals, we identified a subgroup of cattle naturally coinfecting with both *M. bovis* and bovine leukemia virus (BLV).

BLV is a deltaretrovirus genetically related to human T-cell leukemia virus types 1 and 2^{9,10}. It causes enzootic bovine leukosis (EBL), a highly contagious disease affecting cattle populations worldwide, and leading to productivity losses and trade restrictions¹¹. EBL prevalence in South America ranges between 23 and 84%, and in Brazil, the estimates vary between 17 and 60%¹². While most BLV-infected cattle (50–70%) remain asymptomatic, 30–50% develop persistent lymphocytosis, and 1–5% progress to B-cell lymphosarcoma^{9,13}. BLV disrupts immune homeostasis by infecting B and T lymphocytes and inhibiting apoptosis through upregulation of B-cell lymphoma 2¹⁴. While the immunomodulatory effects of BLV are well documented^{15–17}, its impact on the pathogenesis of bTB remains poorly characterized.

In this study, cattle naturally coinfecting with BLV and *M. bovis* were examined to characterize the immune responses associated with the progression of bTB. Additionally, an experimental bovine model was used to evaluate the impact of natural BLV infection on delayed-type hypersensitivity responses.

3.3 Results

3.3.1 BLV infection exacerbates *M. bovis*-associated disease severity in cattle

To characterize the immune response to mycobacteria in cattle naturally coinfecting with BLV and *M. bovis*, we analyzed the associations between mycobacterial burden, intragranuloma organization, severity of pathological lesions, and humoral response against *M. bovis*. *M. bovis*-infected cattle that tested positive for *N. caninum*, *Leptospira* sp., IBR, and BVD were excluded from the study (Fig. 3.1a). Figure 3.1b shows that cattle coinfecting with BLV exhibited significantly higher mycobacterial loads within granulomatous lesions compared with those infected solely with *M. bovis* (BLV/bTB vs. bTB; $p < 0.001$). When assessing disease severity based on the anatomical dissemination of bTB lesions, we observed a relatively high frequency of severe bTB cases, defined as stages IV and V, in BLV/bTB cattle. These animals presented lesions in organs and tissues of the abdominal and/ or thoracic cavity, with or without associated lymph node involvement ($p < 0.001$; Fig. 3.1c). Further analysis using

a semiquantitative scoring system for bTB lung lesions¹⁸ demonstrated that BLV coinfecting cattle (BLV/bTB) exhibited significantly high pathology severity scores ($p < 0.001$; Fig. 3.1d). Additionally, analysis of the immune response in bTB-infected cattle showed that animals coinfecting with BLV exhibited significantly reduced levels of anti-*M. bovis* antibodies compared to those in animals infected with bTB alone ($p < 0.001$; Fig. 3.1e). Consistent with this finding, BLV-infected PPD_b-negative animals displayed significantly reduced levels of anti-BVD and anti-*N. caninum* antibodies in ELISA assay compared to those in the control (BLV-negative) cattle ($p < 0.001$; Fig. 3.1f). Collectively, these results suggest that cattle naturally infected with BLV exhibit impaired adaptive immune responses to *Mycobacterium bovis* as well as to other pathogens, including BVD and *Neospora caninum*.

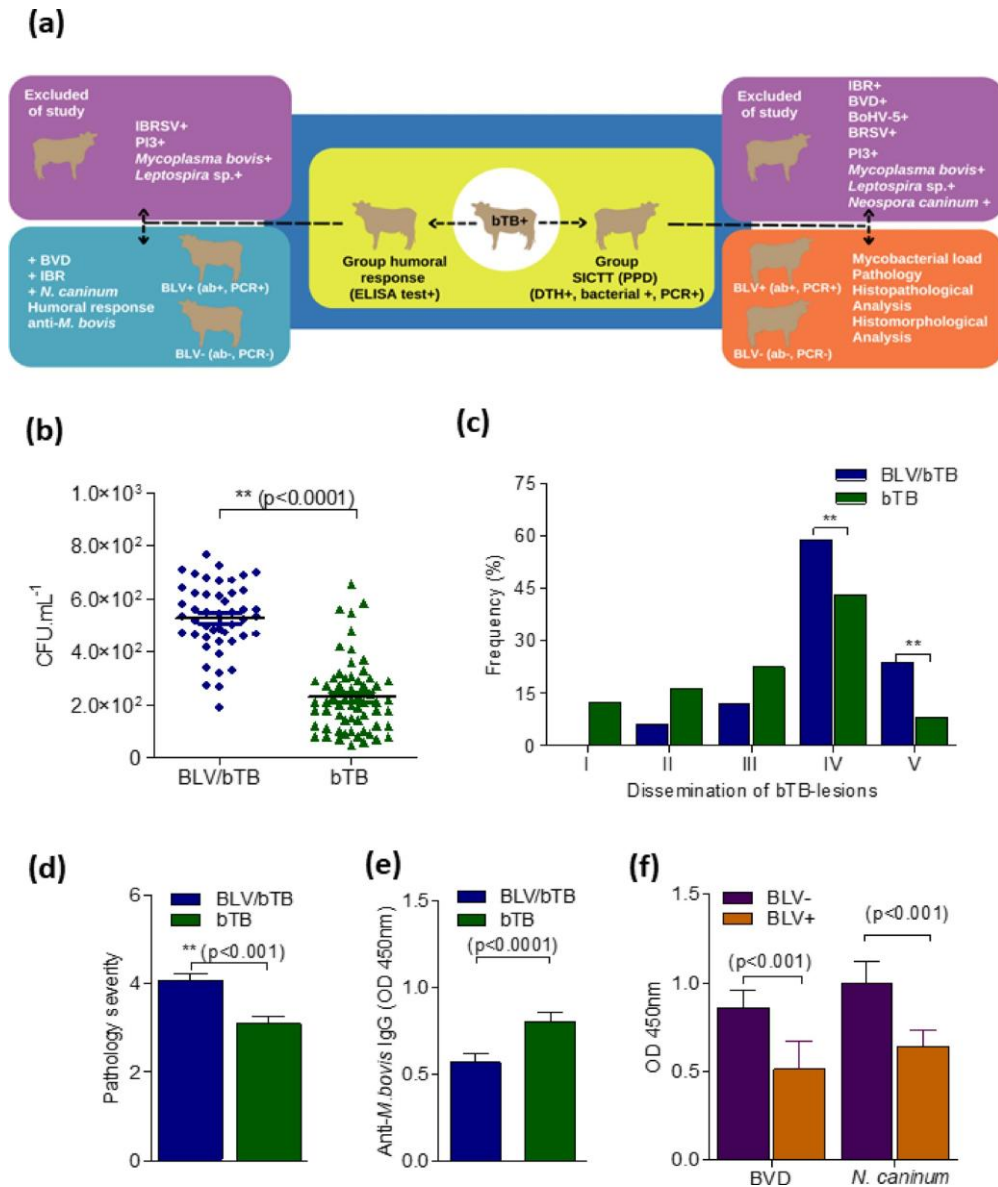


Figure 3.1 Bovine leukosis virus (BLV) infection exacerbates *Mycobacterium bovis*-mediated pathology severity and impairs humoral responses. **(a)** Diagram of animals naturally infected with *M. bovis* used in the study. Animals in the humoral response group (ELISA test + for *M. bovis*) and SICTT (PPD) group (DTH+, *M. bovis*- positive by bacterial and PCR detection) were classified as BLV+ (ab+, PCR+) and BLV- (ab-, PCR-) and tested for co-infections. **(b)** Tissue homogenate was inoculated (Ogawa-Kudoh + sodium pyruvate) and incubated at 37 °C for 8 weeks, colonies were counted, and intragranulomatous mycobacterial loads were determined. **(c)** Frequency of animals naturally infected with *M. bovis* and coinfecting with BLV, categorized according to their anatomical dissemination of bovine tuberculosis (bTB) lesions into five levels: *I*, lesions of bTB in the head lymph nodes including retropharyngeal, mandibular, and parotid lymph nodes; *II*, bTB lesions in the thoracic lymph nodes, including the mediastinal, bronchial, and tracheobronchial lymph nodes, or in abdominal lymph nodes, including the mesenteric, inguinal, gastric, hepatic, splenic, renal, sub-iliac, medial, and lateral iliac lymph nodes; *III*, simultaneous presence of lesions suggestive of bTB infection in thoracic and abdominal lymph nodes; *IV*, bTB

lesions in organs of the thoracic *or* abdominal cavity; and V, simultaneous presence of bTB lesions in organs of the thoracic *and* abdominal cavities. ** indicates $p < 0.001$. **(d)** Pathological severity of bTB lesions in the lungs. **(e)** Analysis of humoral immune response against *M. bovis*. **(f)** Analysis of humoral immune response against bovine viral diarrhea virus (BVD) and *Neospora caninum*. The data are presented as the mean $\pm$ standard error (SEM). Optical density (OD) readings were obtained at a wavelength of 450 nm. Groups analyzed were: BLV-positive (BLV+) and BVD-positive (BVD) ($n = 203$); BLV-negative (BLV-) and BVD-positive (BVD) ($n = 288$); BLV-positive (BLV+) and *N. caninum*-positive (*N. caninum*) ($n = 264$); BLV-negative (BLV-) and *N. caninum*-positive (*N. caninum*) ($n = 221$).

3.3.2 BLV alters granuloma responses to natural *M. bovis* infection in cattle

To explore the immune factors linked to the heightened severity of bTB in BLV/*M. bovis* coinfecting cattle and their potential immunopathological correlates, we performed an in-depth analysis of the cellular composition within tuberculous granulomas in coinfecting animals. In bTB coinfecting animals, tuberculous granulomas exhibited thin or absent encapsulation, with extensive areas of caseous necrosis and mineralization. The granulomatous cellular response was primarily composed of epithelioid macrophages, scattered multinucleated Langhans giant cells, and lymphocyte clusters and included a moderate number of neutrophils (Fig. 3.2a1–4). In contrast, as reported previously⁸, cattle infected solely with *M. bovis* developed densely fibrous encapsulated granulomas, with extensive multicentric areas of caseous necrosis and central dystrophic mineralization (Fig. 3.2a5–8). Their granulomatous cellular response consisted of dense lymphocyte clusters and epithelioid macrophages, increased multinucleated Langhans giant cells, and few or absent neutrophils, which surrounded the necrotic areas (Fig. 3.2a5–8). Quantitative analysis of the granulomatous response revealed that coinfecting animals (BLV/bTB) had significantly lower counts of lymphocytes ($p < 0.001$) and higher numbers of epithelioid macrophages ($p < 0.001$) and neutrophils ($p < 0.001$) than those of bTB-infected animals (Fig. 3.2b). Additionally, histological analysis of granulomatous responses in the lungs and lymph nodes showed that coinfecting cattle exhibited reduced primary granuloma encapsulation ($p < 0.001$; Fig. 3.2c). These results suggest that BLV infection impairs *M. bovis*-induced granuloma structure.

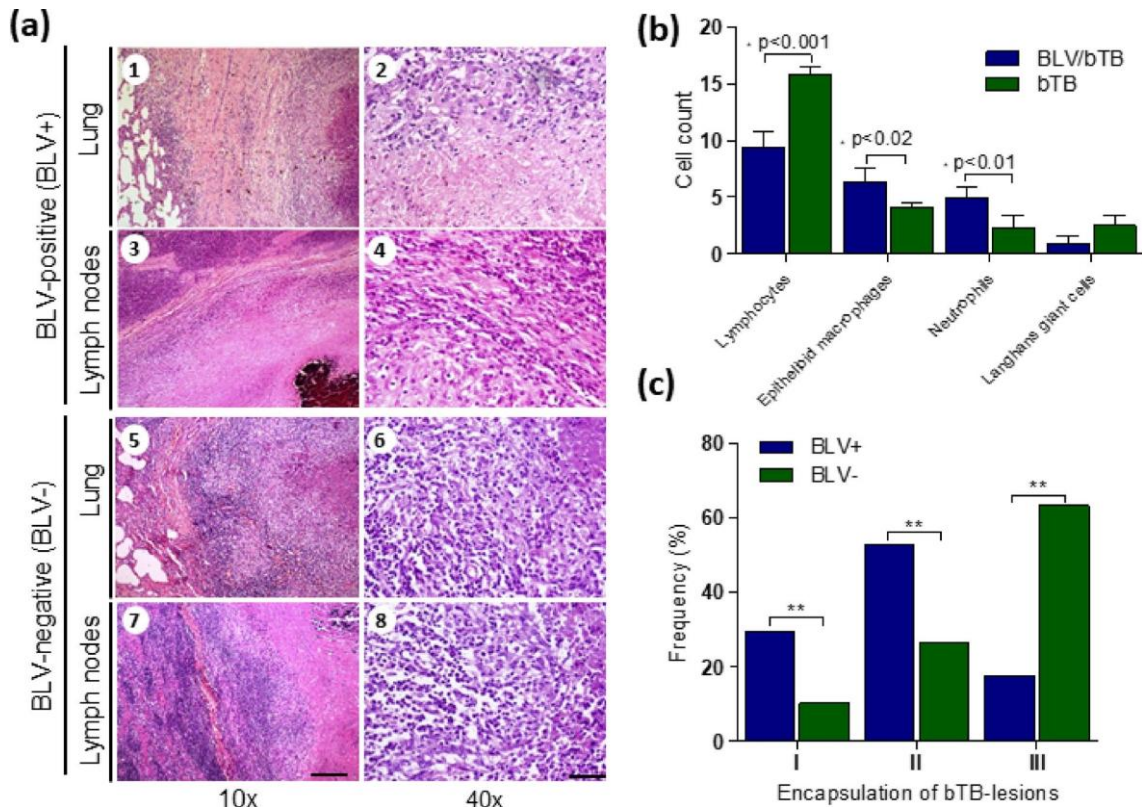


Figure 3.2. Altered granulomatous responses in the lungs and lymph nodes of cattle naturally coinfecting with *Mycobacterium bovis* and bovine leukosis virus (BLV). **(a)** Representative images of lung and lymph nodes; tuberculous granulomatous response patterns are shown. (1–4) Thin or absent encapsulation of granulomas, with extensive areas of caseous necrosis and dystrophic mineralization. (5–8) Dense fibrous encapsulated granulomas, with extensive multicentric areas of caseous necrosis and centralized dystrophic mineralization. Left panels, 10× magnification; scale bar, 200 μm. Right panels, 40× magnification; scale bar, 50 μm. **(b)** Cell count of granulomatous responses (lymphocytes, epithelioid macrophages, neutrophils, langhans giant cells). The data are presented as mean ± standard error (SEM) for images shown in **(a)**. **(c)** Lung granulomas were categorized and scored according to their intensity of encapsulation of primary granulomas into three levels: *I*, thin encapsulation; *II*, dense fibrous capsule; and *III*, thickly fibrous encapsulation. Frequency is shown in the graph. Groups analyzed were lung granulomas from BLV-positive cattle (BLV+, *n* = 102) and BLV-negative cattle (BLV–, *n* = 134). ** indicates *p* < 0.001.

3.3.3 BLV impairs delayed-type hypersensitivity responses to mycobacterial antigens in cattle

The delayed-type hypersensitivity (DTH) response to the skin test, the primary diagnostic tool for detecting bTB, was assessed in naturally BLV-infected cattle. A group of 17 *M. bovis*-negative cattle was primed with *M. bovis* and *M. avium* PPD for 56 days. Following this, 12 animals were exposed to mycobacterial antigens and 5 were treated with

PBS for 72 ± 6 h, and skin reactions were measured (Fig. 3.3a). Hematological analysis of the BLV-infected group confirmed the presence of persistent lymphocytosis (Fig. 3.3b). BLV-infected animals displayed reduced skin fold thickness compared with BLV-negative cattle in response to both bovine ($p < 0.01$) and avian ($p < 0.01$) PPD tuberculin (Fig. 3.3c). Further histopathological analysis of the cellular profile of the DTH reaction revealed a mild lymphohistiocytic infiltrate in BLV-infected cattle, characterized by clustered lymphocytes and scattered macrophages (Fig. 3.3d 1–4). In contrast, noninfected control animals displayed an intense lymphohistiocytic infiltrate, with densely clustered lymphocytes and scattered macrophages (Fig. 3.3d5–8). Cellular pattern analysis of the DTH reaction demonstrated that BLV cattle had significantly lower counts of lymphocytes ($p < 0.001$), histiocytes ($p < 0.001$), and neutrophils than noninfected animals (Fig. 3.3e). These findings indicate that cattle naturally infected with BLV display altered skin DTH responses to mycobacterial antigens.

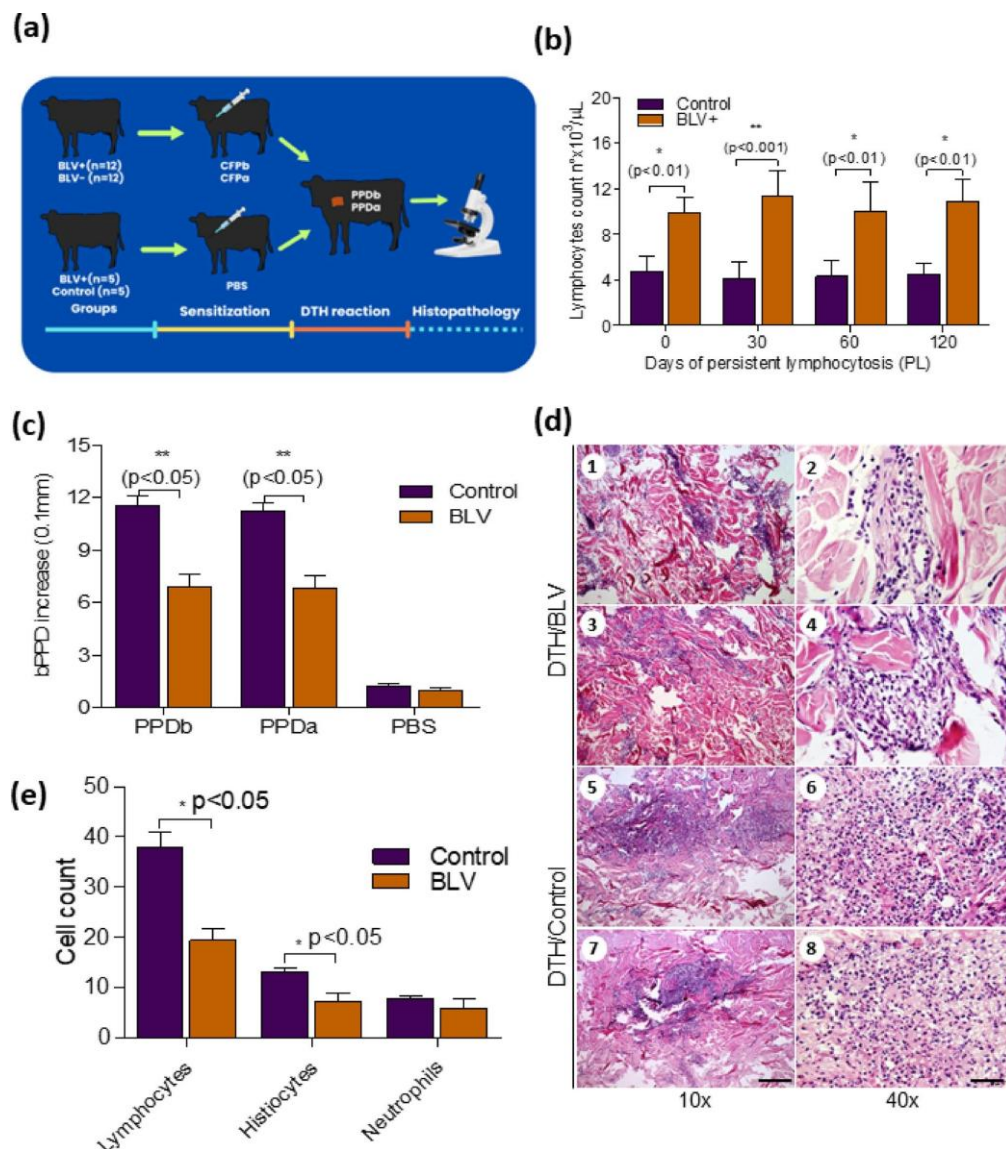


Figure 3.3 Bovine leukosis virus (BLV)-infected cattle with persistent lymphocytosis display impaired DTH responses to mycobacterial antigens. **(a)** Diagram of experimental approach. **(b)** Hematological analysis showing persistent lymphocytosis of the BLV group. **(c)** Skin-test responses (increase of skin fold thickness) of cattle to purified protein derivative (PPD) tuberculin 56 days after injection of *Mycobacterium bovis* (PPDb) and *Mycobacterium avium* (PPDa). The data are presented as the mean $\pm$ standard (SEM) for each group. **(d)** Histopathological analysis of cellular profile of the delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction showing mild lymphohistiocytic infiltrate with clustered lymphocytes and scattered macrophages (BLV) (1 and 2) and intense lymphohistiocytic infiltrate with dense clustered lymphocytes and scattered macrophages (Control) (3 and 4). Slides presented are from four different cattle (two/group) ($n = 16/\text{group}$). Left panels, 10 $\times$ magnification; scale bar, 200 μm . Right panels, 40 $\times$ magnification; scale bar, 50 μm . **(e)** Cell counts of the DTH reaction in the skin. The data presented are mean $\pm$ standard (SEM) for each group shown in (c).

3.4 Discussion

Mycobacterium bovis pathogenesis is critically influenced by the bacterium's capacity to survive within host cells and the host's ability to mount an effective immune response^{19,20}. Coinfections may impair these defense mechanisms, thereby promoting pathogen persistence and transmission^{7,21}. In this study, we employed a naturally infected bovine model to investigate the impact of bovine leukemia virus (BLV) on bTB progression. Our data reveal that BLV coinfection is associated with enhanced disease severity and reduced diagnostic sensitivity, suggesting a complex interplay between viral infection and mycobacterial immunity.

BLV/bTB coinfecting animals exhibited elevated mycobacterial burdens, widespread lesion dissemination, and exacerbated pathological outcomes when compared to *M. bovis*-infected, BLV-negative counterparts. These findings support a model in which BLV-mediated immune modulation facilitates *M. bovis* proliferation. Consistent with our observations, viral coinfections in other models—such as influenza virus or SARS-CoV-2 with *M. tuberculosis*—have been shown to potentiate bacterial pathogenesis and disrupt host immune equilibrium^{22–24}. In our cohort, BLV/bTB animals also demonstrated a marked reduction in humoral responses against MPB70 and MPB83, two antigens commonly targeted in antibody-based diagnostics. This attenuation of antigen-specific antibody levels may compromise serological test sensitivity, thus undermining bTB detection efforts.

Moreover, we observed significant immunological alterations in BLV/bTB animals,

including lymphopenia and neutrophilia, suggestive of skewed leukocyte homeostasis. Granuloma integrity is contingent upon effective lymphocyte recruitment and function. CD4 + Th1 and Th17 cells, CD8 + cytotoxic T cells, and $\gamma\delta$ T cells are known to orchestrate antimycobacterial responses via TNF and IFN- γ secretion^{19,25,26}, while B cells contribute to granuloma structure and stability^{27,28}. The lymphocytic depletion observed here may impair granuloma encapsulation and bacterial containment. Reduced fibrotic encapsulation in BLV/bTB granulomas further supports this hypothesis, as fibrosis has been linked to robust Th1-driven immunity^{29,30}. In contrast, increased neutrophil infiltration—although potentially reflecting a compensatory response—may exacerbate tissue damage, especially given the dysfunctional phagocytic capacity and proinflammatory bias reported in neutrophils from BLV-infected cattle^{31,32}.

A critical aspect of our findings relates to the impact of BLV on delayed-type hypersensitivity (DTH) responses. BLV-infected animals with persistent lymphocytosis exhibited significantly diminished DTH reactivity following mycobacterial antigen challenge. Given that DTH underlies the skin test-based diagnostics commonly employed for bTB (e.g., SICCT, IFN- γ release assays), such suppression may result in false-negative outcomes, thereby complicating surveillance and eradication efforts⁶. Similar diagnostic impairments have been described in coinfections involving *Fasciola hepatica* or bovine viral diarrhea virus, which also interfere with IFN- γ signaling and lymphocyte activation^{7,33–35}.

Although our study utilized a naturally occurring coinfection model, detailed mechanistic insights into BLV-induced immune modulation would benefit from experimental coinfection systems and single-cell immunophenotyping. Still, previous evidence indicates that altered expression of MHC class II and IL-2 receptor pathways in BLV-infected cattle^{21,36} may further compromise antigen presentation and T cell activation, thereby weakening both host immune control and the reliability of diagnostic tests. These immunological disruptions likely contribute to the persistence of *M. bovis* within herds despite ongoing control efforts. Our findings identify BLV as a microbial cofactor capable of modifying the natural history of bTB, attenuating diagnostic accuracy, and sustaining the silent transmission of *M. bovis* in endemic settings. Differences in breed susceptibility, regional management practices, and environmental exposures could affect immune responses to both BLV and *M. bovis*. Thus, while our findings provide crucial insights into the immunopathogenesis of BLV/bTB coinfection, further studies across diverse breeds, geographic regions, and production systems are warranted to validate and extend these observations.

3.5 Methods

3.5.1 Animals

All animals included in this study tested positive in the SICTT (PPD) and were confirmed as positive for *M. bovis* using bacterial culture, polymerase chain reaction (PCR), histopathological examination, and Ziehl–Neelsen staining for acid-fast bacilli (AFB). The study population consisted of 108 crossbred Holstein/Jersey cows, aged between 1.6 and 11 years, which were mandatorily sent to abattoirs following a positive SICTT reaction in compliance with Brazilian regulations^{37,38}. Ethical approval was obtained from the Ethics Committee on Animal Experimentation from the Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UDESC) (Protocol #1.13.10). All procedures were performed in strict accordance with animal welfare regulations and international guidelines for the ethical use of animals in research and complied with the ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>). The animals originated from 18 dairy farms in Santa Catarina State, Brazil, operating under intensive husbandry systems. The SICTT was conducted following the guidelines established by the Brazilian Department of Agriculture^{37,38}. Biological sample collections were performed on animals already destined for slaughter due to a positive bTB diagnosis, in federally inspected abattoirs and in accordance with PNCETB 06/2004 and MAPA 03/2000 regulations, as well as in compliance with Brazilian legislation and international ethical guidelines for animal welfare. Tissue samples from lesions suggestive of tuberculosis, which were identified at slaughter, were collected for histopathological analysis and AFB detection (fixed in 10% buffered formalin) and for mycobacterial culture and PCR detection (refrigerated at 2–8 °C). Additionally, blood samples were collected into ethylenediaminetetraacetic acid-containing tubes for hematological analysis and into tubes without anticoagulant for serological assessment.

3.5.2 Bacteriological culture and identification of *M. bovis* isolates

Tissue samples containing granulomatous lesions were homogenized using a tissue homogenization system (TissueRuptor, Qiagen, Netherlands). Homogenized tissue (1 mL) was decontaminated and concentrated using the modified Petroff method³⁸. For culture, 100 µL

decontaminated homogenate was inoculated into Ogawa– Kudoh medium supplemented with sodium pyruvate (12 mg/mL). Cultures were incubated at 37 °C under aerobic conditions and monitored weekly for contaminants and mycobacterial colony growth. Colony-forming units (CFU) were counted after eight weeks. The reference strains, *M. bovis* AN5 and *M. avium* D4, served as positive controls. Culture- and AFB-positive samples underwent PCR identification targeting IS1081 (approximately 135 bp)³⁹ and RvD1Rv2031c (approximately 500 bp)¹⁰ to distinguish *M. bovis* from *M. tuberculosis* and *M. avium*. Mycobacteria were isolated at the Immunobiology Laboratory of the Federal University of Santa Catarina. All procedures involving tissue homogenization, culture, and handling of mycobacteria were performed under Biosafety Level 3 (BSL-3) conditions to ensure personnel safety and prevent environmental contamination.

3.5.3 Identification of BLV coinfection and hematological analysis

ELISAs for BLV, BVD, IBR, and *Neospora caninum* were performed according to the manufacturer's instructions (IDEXX Laboratories). Microagglutination testing was conducted for *Leptospira* spp. The BLV ELISA specifically detects antibodies directed against the BLV gp51 envelope glycoprotein. Briefly, serum samples were diluted 1:1 in diluent solution and tested in duplicate. Reagents were added to 96-well plates, which were incubated for 30 ± 3 min (18–26 °C). Plates were then washed six times. Positive and negative control reagents were included to validate each microtiter plate and enable data calculation. Absorbance was measured at 450 nm using a spectrophotometer (800TS; Biotek, VT, USA). Real-time PCR assays were performed to detect BLV, BVD, IBR, bovine herpesvirus type 5, bovine respiratory syncytial virus, bovine parainfluenza virus type 3, and *M. bovis*. BLV infection was specifically confirmed using a TaqMan quantitative PCR assay as described by⁴⁰. Reactions were carried out on a QuantStudio 3 instrument (Applied Biosystems) in a final volume of 20 µL. The forward primer MRBLVF (positions 2321–2339) was 5'- CCTCAATTCCCTTTAAACTA-3', the reverse primer MRBLVR (positions 2421–2440) was 5'-GTACCGGG AAGACTGGATTA-3', and the probe (positions 2340–2360) was FAM-5'- GAACGCCTCCAGGCCCTTCA- BHQ-3'. Thermal cycling conditions consisted of an initial reaction at 95 °C for 15 min, followed by 50 cycles of denaturation at 94 °C for 60 s and annealing/extension at 60 °C for 60 s. Hematological analysis was performed on BLV-positive and *M. bovis*-negative cattle that had been inoculated with inactivated bacterial cultures of *M. bovis* (CFPb, *M. bovis* AN5 strain) and *M. avium* (CFPa, *M. avium* D4 strain). Measurements

were conducted using an automated veterinary hematology analyzer (PocH-100iV, Sysmex, Japan), and differential leukocyte counts were assessed manually on Romanowsky-stained blood smears. Persistent lymphocytosis was defined as peripheral blood lymphocyte counts exceeding 8,000 cells/ μ L in at least two hemograms performed at a four-month interval.

3.5.4 Postmortem examination

Comprehensive postmortem examinations were performed on organs and tissues, including the lungs, pleura, pericardium, liver, spleen, intestines, mesentery, kidneys, heart, major muscle groups, genitourinary system, mammary gland, and lymph nodes (parotid, retropharyngeal, mandibular, palatine tonsils, tracheobronchial, bronchial, mediastinal, hepatic, mesenteric, iliac, and sciatic). These tissues were sectioned at 0.5–1.0-cm intervals for detecting visible lesions indicative of bTB. The anatomical dissemination of bTB lesions was categorized into five levels based on a semiquantitative scoring system^{8,18}.

- Level I: Lesions confined to lymph nodes of the head (retropharyngeal, mandibular, and parotid).
- Level II: Lesions present in thoracic lymph nodes (mediastinal and tracheobronchial) or abdominal lymph nodes (mesenteric, inguinal, hepatic, gastric, splenic, renal, and iliac).
- Level III: Simultaneous involvement of thoracic and abdominal lymph nodes.
- Level IV: Lesions present in thoracic or abdominal organs with or without involvement of draining lymph nodes.
- Level V: Concurrent lesions in both thoracic and abdominal organs with or without the involvement of the associated lymph nodes.

Lung lobes (left caudal, left cranial, right cranial, right caudal, middle, and accessory) were sectioned and scored from 0 to 5, with 0 indicating no visible lesions and 5 denoting extensive coalescing lesions. A similar scoring system was applied to lesions observed in major organs and tissues, including the pleura, pericardium, liver, spleen, intestines, mesentery, and reproductive system. Lymph nodes were transversely sectioned at 0.5–1.0-cm intervals and scored from 0 to 3, with 0 representing the absence of visible bTB lesions and 3 indicating coalescent lesions.

3.5.5 Histopathological and histomorphological analysis

Tissue samples for histopathological evaluation were fixed in 10% formalin in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2–7.4), dehydrated in ethanol, embedded in paraffin, and sectioned (4 μ m) using a semiautomatic microtome. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for general histological evaluation, Masson's Trichrome for collagen fibers (fibrosis), and Ziehl–Neelsen for AFB detection. Granulomas in various organs were classified into four developmental stages¹⁹:

- Stage I: Initial lesion.
- Stage II: Solid granulomas.
- Stage III: Small necrotic areas.
- Stage IV: Necrosis with mineralization.

Granulomas were further categorized into four groups based on cellular composition and structural organization⁸. Encapsulation was classified into three levels:

- Level I: Thin encapsulation.
- Level II: Well-defined thin fibrous capsule.
- Level III: Thick and dense capsule.

3.5.6 Experimental analysis of the DTH

A total of 34 crossbred Holstein/Jersey cows (17 BLV-positive and 17 BLV-negative) aged between 1.5 and 2 years that tested negative for bTB in the SICCTT (PPD) were included in the study. Twelve BLV-positive and 12 BLV-negative cows were subcutaneously injected with 5 mL (180 mg/mL) inactivated bacterial culture of *M. bovis* (CFPb, *M. bovis* AN5 strain) and *M. avium* (CFPa, *M. avium* D4 strain). The control groups received 5 mL sterile PBS.

DTH was determined by measuring the increase in skin fold thickness (mm) after 56 days of sensitization. Two points in the medial cervical region, 15–20-cm apart, were trichotomized (± 3 cm²), and the skin fold was measured using a calibrated cutimeter. PPD (0.1 mL) of *M. bovis* strain AN5 (PPDb, 1 mg/mL) and *M. avium* strain D4 (PPDa, 0.5 mg/mL) were injected into both points. The skin fold thickness at the PPD application sites was

measured 72 ± 6 h after inoculation. The size of the DTH reaction was determined individually for each animal. Animals that presented an area of reaction ≤ 0.5 mm at the application site for one or both antigens were considered anergic and were excluded from the analysis. After assessing DTH, a skin biopsy was performed at the reaction site. The tissue fragments were fixed in 10% buffered formalin solution (pH 7.2–7.4) for 48 h. Then, the tissue samples were embedded in paraffin, sectioned (4 μ m), and stained with H&E. The histomorphological analysis and image capturing were performed using an Olympus BX40 optical microscope.

3.5.7 Humoral responses against *M. bovis*

An IDEXX *M. bovis* Ab Test kit was used for detecting antibodies against the *M. tuberculosis* complex antigens MPB70 and MPB83, according to the manufacturer's instructions. Briefly, serum samples were diluted 50-fold in PBS and tested in duplicate. The test reagents (100 μ L) were added to a 96-well plate, which were set up in duplicate, and incubated for 60 min, and the wells were then washed six times. Positive and negative test control reagents were used to validate each microtiter plate and obtain data for calculation. The absorbance at 450 nm was measured using a spectrophotometer (800TS; Biotek, VT, USA).

3.5.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software Inc.). Differences in frequencies of categorical variables, such as lesion dissemination levels and granuloma encapsulation levels, were assessed using the Chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. Continuous variables, including mycobacterial load, pathology scores, antibody titers, cell counts, and DTH responses, were analyzed using the Mann–Whitney nonparametric test due to non-normal data distribution. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Corresponding p-values are also reported. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3.6 Data availability

All relevant raw data will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes, without breaching participant confidentiality. Requests for access should be made directly to the corresponding author.

3.7 References

1. Dametto, L. L., dos Santos, E. D., Santos, L. R. & Dickel, E. L. Bovine tuberculosis: diagnosis in dairy cattle through the association of analyzes. *Pesq Vet. Bras.* **40**, 12–16 (2020).
2. Rahman, M. M. et al. Data on proteomic analysis of milk extracellular vesicles from bovine leukemia virus-infected cattle. *Data Brief.* **33**, 106510 (2020).
3. Borham, M. et al. A review of bovine tuberculosis: an emerging disease associated with multidrug- resistant mycobacterial species. *Pathogens.* **11**, 715 (2022).
4. Waters, W. R. et al. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 768542 (2011).
5. Moens, C., Saegerman, C., Fretin, D. & Marché, S. Field evaluation of two commercial serological assays for detecting bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* **159**, 125–132 (2023).
6. de la Rua-Domenech, R. et al. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* **81**, 190–210 (2006).
7. Claridge, J. et al. *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nat. Commun.* **3**, 853 (2012).
8. Menin, Á. et al. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PLoS One.* **8**, e53884 (2013).

9. Burny, A. et al. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet. Microbiol.* **17**, 197–218 (1988).
10. Rodriguez, J. G. et al. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2330–2332 (1999).
11. Bartlett, P. C. et al. Current developments in the epidemiology and control of enzootic bovine leukosis as caused by bovine leukemia virus. *Pathogens.* **9**, 1058 (2020).
12. Marawan, M. A. et al. Bovine leukaemia virus: current epidemiological circumstance and future prospective. *Viruses.* **13**, 2167 (2021).
13. Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M. & Takeshima, S. N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front. Microbiol.* **4**, 328 (2013).
14. Glazko, V. I. & Kosovsky, G. Y. Structure of genes coding the envelope proteins of the avian influenza A virus and bovine leukosis virus. *Russ. Agric.Sci.* **39**, 511–515 (2013).
15. Ikebuchi, R. et al. Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. *Vet. Res.* **44**, 59 (2013).
16. Konnai, S. et al. Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **36**, 63–69 (2013).
17. Okagawa, T. et al. Cooperation of PD-1 and LAG-3 in the exhaustion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells during bovine leukemia virus infection. *Vet. Res.* **49**, 50 (2018).
18. Vordermeier, H. M. et al. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* **70**, 3026–3032 (2002).

19. Wangoo, A. et al. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68 + cells. *J. Comp. Pathol.* **133**, 223–234 (2005).
20. Gutierrez, M. G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* **119**, 753–766 (2004).
21. Hughes, M. S. et al. Molecular analyses of mycobacteria other than the *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. *Vet. Microbiol.* **108**, 101–112 (2005).
22. Walaza, S. et al. Influenza and tuberculosis co-infection: a systematic review. *Influenza Other Respir. Viruses.* **14**, 77–91 (2020).
23. Pathak, L. et al. Coronavirus activates an altruistic stem cell-mediated defense mechanism that reactivates dormant tuberculosis. *Am. J. Pathol.* **191**, 1255–1268 (2021).
24. Hildebrand, R. E. et al. Superinfection with SARS-CoV-2 has deleterious effects on *Mycobacterium bovis* BCG immunity and promotes dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0307522 (2022).
25. Qu, M. et al. Antibodies targeting the cell wall induce protection against virulent *Mycobacterium bovis* infection. *Microbiol. Spectr.* **11**, e0343122 (2023).
26. Plattner, B. L., Huffman, E. L. & Hostetter, J. M. Gamma delta T-cell responses during subcutaneous *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis challenge in sensitized or Naive calves using matrix biopolymers. *Vet. Pathol.* **50**, 630–637 (2013).
27. Orme, I. M. & Basaraba, R. J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Semin. Immunol.* **26**, 601–609 (2014).
28. Gao, X. et al. Interleukin 8 and pentaxin (C-reactive protein) as potential new biomarkers of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **57**, e00274–e00219 (2019).

29. Gil, O. et al. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS One*. **5**, e10030 (2010).
30. Ndlovu, H. & Marakalala, M. J. Granulomas and inflammation: host-directed therapies for tuberculosis. *Front. Immunol.* **7**, 434 (2016).
31. Eruslanov, E. B. et al. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect. Immun.* **73**, 1744–1753 (2005).
32. Lv, G., Wang, H., Wang, J., Lian, S. & Wu, R. Effect of BLV infection on the immune function of polymorphonuclear neutrophil in dairy cows. *Front. Vet. Sci.* **8**, 737608 (2021).
33. Flynn, R. J., Mannion, C., Golden, O., Hacariz, O. & Mulcahy, G. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* **75**, 1373–1381 (2007).
34. Costa, M. et al. *Fasciola hepatica* infection modifies IgG1 specific immune response to foot-and-mouth disease virus induced by vaccination. *Vaccine* **42**, 541–547 (2024).
35. Charleston, B., Hope, J. C., Carr, B. V. & Howard, C. J. Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* **149**, 481–484 (2001).
36. Stone, D. M., Norton, L. K., Chambers, J. C. & Meek, W. J. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. *Clin. Immunol.* **96**, 280–288 (2000).
37. Brazil & SDA. Ministry of Agriculture and Livestock Secretariat of Agricultural Defense. Manual of the qualified veterinarian. Brasília, DF, MAPA/: 39 (2024).
https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/progra_mas-de-saude-animal/pncebt/Manual_MVH_03.04.25.pdf
38. OIE. The manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: Bovine

tuberculosis. World Animal Health Information Database (WAHID): The World Organization for Animal Health (OIE): 590 (2011).

39. Taylor, G. M., Worth, D. R., Palmer, S., Jahans, K. & Hewinson, R. G. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet. Res.* **3**, 12 (2007).
40. Rola-Luszczak, M., Finnegan, C., Olech, M., Choudhury, B. & Kuzmak, J. Development of an improved real-time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J. Virol. Methods.* **189**, 258–264 (2013).

3.8 Acknowledgements

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for providing scholarships to AM and NMMB. This work was partially supported by the Howard Hughes Medical Institute – Early Career Scientist program (AB; grant #55007412). AB and ARP are research fellows of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

3.9 Author contributions

Conceptualization, Á.M. and A.B.; methodology, Á.M., N.M.M.B., M.E.H., C.R., L.L.N., R.A.P., A.B.; investigation, Á.M., N.M.M.B., M.E.H., C.R., L.L.N., R.A.P., A.B.; data curation, A.M. A.B.; formal analysis, A.M. A.B.; writing—original draft preparation, Á.M., N.M.M.B., A.B.; resources, A.M., N.M.M.B., A.B.; funding acquisition, A.M., A.N.; writing—review and editing, Á.M., N.M.M.B., M.E.H., C.R., L.L.N., R.A.P., A.B.; validation, A.M., N.M.M.B., A.B.; visualization, M.E.H., C.R., L.L.N., R.P.; supervision, Á.M. and A.B.; project administration, Á.M. and A.B. All authors read and approved the final manuscript.

CAPÍTULO 4

Discussão geral

O desenvolvimento de métodos diagnósticos rápidos e precisos da bTB ainda é um desafio. O padrão ouro para diagnóstico da bTB, o isolamento bacteriano, leva até três meses para ser concluído (Oie, 2018; Soares-Filho et al., 2019). Enquanto isso, o teste de tuberculinização cervical comparativo (SICTT) é extremamente custoso e laborioso, exigindo ao menos a necessidade de uma segunda visita para avaliação dos resultados (Ameni et al., 2018). O diagnóstico baseado em anticorpos é amplamente utilizado para detectar doenças infecciosas (Bai et al., 2018; Hao et al., 2020) podendo ser aplicado ao diagnóstico da bTB devido à sua rapidez e simplicidade de realização, especialmente em países com alta prevalência da bTB, se a sensibilidade e o nível de especificidade forem elevados. Além disso, não apresenta grande variação de resultados como o SICTT (Karolemeas et al., 2012). A capacidade de detecção do SICTT pode variar de 40–80% (Karolemeas et al., 2012), com sensibilidade entre 69–76% e especificidade de 86–96% (Smith et al., 2021), enquanto 1–5% dos bovinos infectados com *M. bovis* podem ser completamente anérgicos ao longo da vida (Pollock & Nail, 2002) ou apresentam resultados negativos no SICTT (Rodrigues et al., 2017). Com isso, os testes de ELISA têm sido considerados uma ferramenta complementar ao SICTT no diagnóstico da bTB, com a vantagem do uso do ELISA identificar animais que apresentam resultados falso-negativos, muitas vezes causados pela anergia (Griffa et al., 2020). Ademais tem sido relatada a detecção precoce de anticorpos IgM e IgG contra *M. bovis* no soro e no leite de bovinos infectados, que podem ser detectados 18–31 dias após a infecção (Lyashchenko et al., 2017).

Embora a detecção de anticorpos em soro de bovinos seja uma abordagem utilizada para o diagnóstico ainda há a necessidade de mais pesquisas devido a ocorrência de resultados controversos e à variabilidade dos achados, indicando que os métodos atuais demandam de aprimoramento para garantir maior precisão e confiabilidade (McCallan et al., 2014). Estudos anteriores comprovaram o potencial do sorodiagnóstico no controle e progressão da bTB, principalmente em soro de bovinos assintomáticos (Waters et al., 2017; McCallan 2017; Moens 2023). Com isso, no presente estudo, um ELISA baseado no antígeno Mb1454 foi desenvolvido e validado para detecção de anticorpos anti-*M. bovis* em amostras de soro de bovinos positivos e negativos para bTB. Posteriormente os efeitos da coinfecção entre *M. bovis* e BLV em bovinos naturalmente infectados e sua interferência no diagnóstico da bTB foi investigada. A avaliação

da antigenicidade da proteína Mb1454 usando soros de camundongos C57BL/6 imunizados com Mb1454 demonstrou um aumento acentuado nos níveis de IgG anti-Mb1454 7 e 21 dias após a imunização, em comparação ao dia 0 (soro pré-imune), indicando uma resposta humoral antígeno-específica robusta. Em um estudo anterior de Nogueira et al. (2010), o antígeno homólogo de Mb1454 (sMTL-13) demonstrou alta antigenicidade e capacidade de induzir a produção de anticorpos, tornando Mb1454 um antígeno promissor para a detecção de anticorpos anti-*M. bovis* em testes sorodiagnostics. Em contraste, outro estudo (Moens et al., 2023) não obteve a reatividade esperada para Mb1454 em soros de quatro bovinos infectados durante a avaliação da imunogenicidade de proteínas candidatas para inclusão no ensaio Luminex-bTB. No entanto, é importante ressaltar que o estudo envolveu uma amostra pequena e animais de uma região geográfica diferente, possivelmente criados em diferentes manejos e condições ambientais, o que pode ter influenciado a resposta imune a esse antígeno específico.

Até o momento, os testes sorológicos são predominantemente baseados nos antígenos MPB70 e MPB83, considerados os principais e mais estudados antígenos micobacterianos (Wiker, 2009), utilizados na detecção de anticorpos específicos pelo teste IDEXX *M. bovis* Ab. Não há diferenças entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* nas sequências das proteínas expressas codificadas pelos genes *mpb70/mbt70* e *mpb83/mbt83* (Hewinson et al., 1996; Matsuo et al., 1996). Da mesma forma, a proteína Mb1454 é homóloga à lectina semelhante à ricina de 13 kDa secretada por *M. tuberculosis* (sMTL-13), com peso molecular aproximado de 16,8 kDa, conforme demonstrado após sua expressão e purificação (Nogueira et al., 2010).

A análise de desempenho do ELISA desenvolvido com a proteína Mb1454 demonstrou sensibilidade de 92,9% e especificidade de 90,0%, indicando alta capacidade de discriminação entre soros positivos e negativos para tuberculose bovina, conforme confirmado pela área sob a curva ROC (Receiver Operating Characteristic) de 0,96 (coeficiente de variação de 95%; intervalo de confiança 0,93-0,98; $p < 0,0001$). Testes com valores de AUC entre 0,7 e 0,8 apresentam alta capacidade de diferir entre indivíduos infectados e não infectados (Mandrekar, 2010; Zhao et al., 2017). Em comparação, nesta avaliação, o teste IDEXX *M. bovis* Ab obteve valores de sensibilidade e especificidade de 53,1% e 82,5%, respectivamente, com uma AUC de 0,69. De acordo com seus desenvolvedores, esses valores são de aproximadamente 63% para sensibilidade e 98% para especificidade (Waters et al., 2011). Para confirmação experimental, o ELISA-Mb1454 demonstrou alta especificidade imunoanalítica, não apresentando reatividade cruzada com patógenos bovinos comuns testados, como alfa-herpesvírus bovino 1 (BoAHV-

1), alfa-herpesvírus bovino 5 (BoAHV-5), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), *Neospora caninum*, *Brucella abortus* e *Leptospira sp.* Antígenos com alta reatividade cruzada levam a resultados falso-positivos, reduzindo a especificidade do imunoensaio (Wang et al., 2023).

Além disso, o ELISA-Mb1454 reduziu significativamente a ocorrência de falsos negativos em animais não detectados pelo teste IDEXX *M. bovis* Ab, alcançando uma precisão de 91%. Em comparação, a precisão do teste IDEXX *M. bovis* Ab foi de 68,2%, indicando um desempenho diagnóstico aproximadamente 23% maior para o ELISA Mb1454. A redução de falsos negativos e positivos está relacionada ao aumento da sensibilidade e especificidade do método (Khalid et al., 2023). No entanto, desenvolver um teste com 100% de precisão é desafiador devido à presença de múltiplos fatores de interferência (Elnaggar et al., 2017; Khalid et al., 2023), incluindo anergia do hospedeiro, imunossupressão e respostas imunes cruzadas desencadeadas pela exposição ou infecção por outros microrganismos (Karuppusamy et al., 2019; Waters et al., 2011). Fatores individuais e populacionais, como resposta imune específica da raça, diferenças regionais na prevalência de doenças, práticas de manejo do rebanho, estado nutricional e estressores ambientais, também podem modular a resposta imune humoral ao *Mycobacterium bovis*.

Esses resultados, combinados com a análise histopatológica, nos permitiram estabelecer uma correlação entre a gravidade das lesões de bTB e a resposta de IgG detectada pelos testes ELISA-Mb1454 e IDEXX *M. bovis* Ab. Para a resposta humoral anti-Mb1454 e anti-MPB70/MPB83, as pontuações médias obtidas para PC1 e PC2 não foram significativamente associadas ao título de anticorpos por estágio da lesão. Esses dados sugerem a ausência de uma relação proporcional entre a quantidade de anticorpos circulantes no sangue periférico e a presença de lesões histopatológicas mais graves causadas por bTB. Achados semelhantes foram observados durante a infecção por *M. tuberculosis* em humanos, nos quais a gravidade da doença não afetou a resposta de IgG. Além disso, indivíduos assintomáticos apresentaram baixos níveis de anticorpos contra antígenos de *M. tuberculosis* (Dewi et al., 2023). Outro estudo (Niki et al., 2015) indicou que não há relação entre os níveis de IgG como marcador imunológico e a gravidade da tuberculose em humanos. Por outro lado, indivíduos com tuberculose ativa frequentemente apresentam níveis elevados de anticorpos (Osada-Oka et al., 2013; Simonney et al., 2007). Devido ao padrão estrutural da resposta granulomatosa, bovinos com lesões em estágios avançados (3 e 4) apresentam carga micobacteriana reduzida (Larenas-Muñoz et al., 2022; Menin et al., 2013), o que pode interferir na resposta imune humoral.

Portanto, a relação entre o número de anticorpos e a gravidade das lesões de tuberculose bovina é bastante complexa e nem sempre direta. Anticorpos IgG detectados em níveis mais elevados podem estar associados à doença ativa. No entanto, de acordo com nossas observações, o número de anticorpos não é o único indicador da resposta imune contra a tuberculose bovina, e outros fatores devem ser considerados, necessitando de mais estudos.

Em nível experimental, a pesquisa na área apresenta limitações devido à complexidade da doença. Isso ocorre porque a resposta imune celular diminui nas doenças micobacterianas. Por outro lado, à medida que a doença progride, a resposta imune humoral aumenta (Van Hooij et al., 2016). No entanto, é importante reconhecer que a resposta imune humoral ao *M. bovis* podem ser influenciada por múltiplos fatores, incluindo variabilidade genética entre raças bovinas, condições ambientais, práticas de manejo do rebanho e exposição regional a patógenos. Tai variáveis podem afetar a produção de anticorpos, alterar a sensibilidade ou especificidade do teste e, conseqüentemente, impactar a consistência diagnóstica em condições de campo. Como observado neste estudo, bovinos coinfectados (bTB/BLV) exibiram níveis reduzidos de anticorpos contra antígenos do complexo MTBC (MPB70/MPB83), contribuindo para uma progressão mais rápida da doença e redução da sensibilidade dos testes diagnósticos baseados em anticorpos como ELISA. Foram observadas alterações significativas nas populações de células imunes em bovinos bTB/BLV, incluindo redução do número de linfócitos e aumento da contagem de neutrófilos. Essas alterações podem prejudicar a formação, função (Orme & Basaraba, 2014) e homeostase dos granulomas, visto que células TCD4 (Th1/Th17), CD8 e $\gamma\delta$ produzem TNF e IFN- γ , citocinas essenciais para a resposta antimicobacteriana (Wangoo et al., 2005; Plattner et al., 2012). O número reduzido de linfócitos em granulomas pode interferir no encapsulamento das lesões e comprometer a contenção bacteriana. A redução da fibrose observada em bovinos bTB/BLV, corrobora esta noção, visto que o encapsulamento do granuloma depende de uma forte resposta Th1 (Gil et al., 2010; Ndlovu et al., 2016). Neutrófilos em bovinos infectados por BLV apresentam comprometimento da fagocitose e da função respiratória, juntamente com o aumento da produção de fatores pró-inflamatórios, potencialmente levando a danos imunopatológicos nos tecidos (Lv et al., 2021).

A coinfecção por BLV também interferiu na resposta de hipersensibilidade tardia (DTH), onde bovinos BLV positivos exibiram resposta DTH significativamente menor em comparação aos bovinos BLV negativos. Os resultados indicaram que bovinos bTB/BLV apresentam bTB mais grave que animais *M. bovis* positivos mas BLV negativos. Bovinos

bTB/BLV apresentaram maiores cargas micobacterianas, maior disseminação das lesões e maior gravidade da patologia, sugerindo que a coinfeção por BLV interfere na relação patógeno-hospedeiro, comprometendo a resposta imune e aumentando a susceptibilidade à infecção por *M. bovis*. Achados semelhantes foram relatados em outros modelos de coinfeção, como vírus influenza/*M. tuberculosis* (Walaza et al., 2019) e SARS CoV 2/*M. tuberculosis* (Pathak et al., 2021; Hildebrand et al., 2022). Estudos avaliando o modelo de infecção entre HIV/*M. tuberculosis* demonstraram a incapacidade dos hospedeiros coinfectados de montar redes de sinalização TNF-TNFR eficazes e respostas pró-inflamatórias relacionadas contra o *M. tuberculosis*, dificultando funções imunorregulatórias e prejudicando a imunidade efetiva (Kgoadi, et al., 2025).

Observou-se que a coinfeção por BLV interferiu na resposta de hipersensibilidade tardia (DTH), impactando a sensibilidade do SICTT. Bovinos bTB/BLV com LP persistente, exibiram resposta DTH significativamente menor em comparação com bovinos BLV negativos. Como a resposta DTH sustentam diagnósticos como o SICTT e IGRAs, uma resposta suprimida em bovinos coinfectados com BLV pode resultar em diagnósticos falso negativos, prejudicando programas de controle da bTB (De La Rua Domenech et al., 2006).

Estudos demonstraram que a coinfeção por *Fasciola hepatica*/*M. bovis* pode reduzir a sensibilidade ao SICTT (Flynn et al., 2007; Claridge et al., 2012). Da mesma forma infecção persistente por BVD suprime as respostas de IFN- γ e a proliferação de linfócitos (Charleston et al., 2001). Em bovinos infectados com BLV, o aumento da expressão do MHC classe II (MHC II) e da sinalização do receptor de IL2 pode alterar a função das células B (Stone et al., 2000; Hughes et al., 2005), interferindo potencialmente nos ensaios diagnósticos da bTB. Kelly et al. (2022) relataram que a coinfeção com agentes imunossupressores como o vírus BLV pode favorecer a ocorrência de resultados falso-negativos e contribuir para a anergia, enfatizando assim a importância das coinfeções para a resposta antimicobacteriana e capacidade preditiva dos testes diagnósticos (Claridge et al., 2012). Adicionalmente, Erskine et al. (2012) demonstraram que bovinos bTB/BLV apresentam células mononucleares do sangue periférico com menor proporção de linfócitos T e maior proporção de células B quando comparados com animais BLV negativos (Erskine et al., 2011).

Dessa forma, o controle da tuberculose bovina (bTB) pode ser dificultado pelas limitações dos métodos de diagnóstico em animais coinfectados, uma vez que há uma redução na sensibilidade dos testes intradérmicos em bovinos coinfectados com *M. bovis*, devido a uma

resposta imune celular prejudicada ao *M. bovis* (Claridge et al., 2012), o que sugere uma predileção do uso de diagnósticos sorológicos em casos de coinfeções. A incidência de BLV e bTB, é significativamente maior em países em desenvolvimento (Ainsworth et al., 2018; Little, 2019), e tende a se sobrepor, especialmente devido às dificuldades na implementação de medidas sanitárias eficazes e à transmissão facilitada pela alta densidade de animais. Desta forma, os resultados aqui apresentados podem sugerir que ambientes com alta prevalência de BLV apresentam um risco maior de infecção por *M. bovis*, possivelmente devido à interferência imunológica causada pela coinfeção, reforçando a importância de estratégias integradas de controle e diagnósticos mais confiáveis.

4.1 Conclusão

O ELISA-Mb1454 apresentou capacidade discriminatória entre soros de bovinos positivos e negativos para *Mycobacterium bovis*, evidenciando seu potencial como ferramenta diagnóstica para a bTB. Além disso, foi observada que a ocorrência de coinfeção entre *M. bovis* e o BLV pode influenciar negativamente a interação patógeno-hospedeiro, comprometendo a resposta imune adaptativa frente ao *M. bovis* e, conseqüentemente, levantando a quadros mais graves da doença além de afetar potencialmente o diagnóstico da tuberculose bovina baseado na hipersensibilidade tipo IV (teste de tuberculinização) e comprometer a resposta imune humoral frente a agentes como *Neospora caninum* e Virus da diarreia viral bovina (BVD).

4.2 Referências

- AINSWORTH, S.; WILKINS, M.J.; NORBY, B.; BYREM, T.M.; BARTLETT, P.C. Prevalence of bovine leukemia virus antibodies in US dairy cattle. **Veterinary Medicine International**, p. 5831278, 2018.
- AMENI, G.; TAFESS, K.; ZEWEDE, A.; EGUALE, T.; TILAHUN, M.; HAILU, T.; SIRAK, A.; SALGUERO, F.J.; BERG, S.; ASEFFA, A.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin reduces the frequency and severity of lesions of bovine tuberculosis under a natural transmission setting in Ethiopia. **Transboundary Emerging Diseases**, v.65, n.1, p.96-104, 2018.
- BAI, X.J.; YANG, Y.R.; LIANG, J.Q.; AN, H.R.; WANG, J.; LING, Y.B.; WANG, Z.Y.; WU, X.Q. Diagnostic performance and problem analysis of commercial tuberculosis antibody detection kits in China. **Military Medical Research**, v.5, n.1, p.10, 2018.
- CHARLESTON, B.; HOPE, J.C.; CARR, B.V.; HOWARD, C.J. Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Record**, v.149, n.16, p.481-4, 2001.
- CLARIDGE, J.; DIGGLE, P.; MCCANN, C.M.; MULCAHY, G.; FLYNN, R.; MCNAIR, J.; STRAIN, S.; WELSH, M.; BAYLIS, M.; WILLIAMS, D.J.L. *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. **Nature Communications**, v.22, n.3, p.853, 2012.
- DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, R.S. *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.2, p.190-210, 2006.
- DEWI, D.N.S.S.; MERTANIASIH, N.M.; SOEDARSONO.; HAGINO, K.; YAMAZAKI, T.; OZEKI, Y.; ARTAMA, W.T.; KOBAYASHI, H.; INOUCHI, E.; YOSHIDA, Y.; ISHIKAWA, S.; SHABAN, A.K.; TATEISHI, Y.; NISHIYAMA, A.; ATO, M.; MATSUMOTO, S.

Antibodies against native proteins of *Mycobacterium tuberculosis* can detect pulmonary tuberculosis patients. **Scientific Reports**, v.13, n.1, p.12685, 2023.

ELNAGGAR, M.M.; ABDELLRAZEQ, G.S.; ELSISY, A.; MAHMOUD, A.H.; SHYBOUB, A.; SESTER, M.; KHALIEL, S.A.; SINGH, M.; TORKY, H.A.; DAVIS, W.C. Evaluation of Antigen Specific Interleukin-1 β as a Biomarker to Detect Cattle Infected with *Mycobacterium bovis*. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v.105, p.53–59, 2017.

ERSKINE, R.; BARTLETT, P.; BYREM, T.; RENDER, C.; FEBVAY, C.; HOUSEMAN, J. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.727–734, 2012.

ERSKINE, R.J.; CORL, C.M.; GANDY, J.C.; SORDILLO, L.M. Effect of infection with bovine leukosis virus on lymphocyte proliferation and apoptosis in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, n.8, p.1059-64, 2011.

FLYNN, R.J.; MANNION, C.; GOLDEN, O.; HACARIZ, O.; MULCAHY, G. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, v.75, n.3, p.1373-1381, 2007.

GIL, O.; DÍAZ, I.; VILAPLANA, C.; TAPIA, G.; DÍAZ, J.; FORT, M.; CÁCERES, N.; PINTO, S.; CAYLÀ, J.; CORNER, L.; DOMINGO, M.; CARDONA, P.J. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. **Plos One**, v.5, n.4, e10030, 2010.

GRIFFA, N.; MOYANO, R.D.; CANAL, A.M.; TRAVERÍA, G.E.; SANTANGELO, M.P.; ALONSO, N.; ROMANO, M.I. Development and Diagnostic Validation of an ELISA Based on an Antigenic Mixture for the Detection of Bovine Tuberculosis. **Veterinary Journal**, v.256, 105426, 2020.

HAO, X.; BAI, J.; DING, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; YAO, L.; PAN, W. Characterization of antibody response against 16kD and 38kD of *M. tuberculosis* in the assisted diagnosis of active pulmonary tuberculosis. **Annals of Translational Medicine**, v.8, n.15, p.945, 2020.

HEWINSON, R.G.; MICHELL, S.L.; RUSSELL, W.P.; MCADAM, R.A.; JACOBS, W.R.JR. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. **Scandinavian journal of immunology**, v.43, n.5, p.490-499, 1996.

HILDEBRAND, R.E.; CHANDRASEKAR, S.S.; RIEL, M.; TOURAY, B.J.B.; ASCHENBROICH, S.A.; TALAAT, A.M. Superinfection with SARS-CoV-2 Has Deleterious Effects on *Mycobacterium bovis* BCG Immunity and Promotes Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology Spectrum**, v.10, n.5, e0307522, 2022.

HUGHES, M.S.; BALL, N.W.; MCCARROLL, J.; ERSKINE, M.; TAYLOR, M.J.; POLLOCK, J.M.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Molecular analyses of mycobacteria other than the *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. **Veterinary Microbiology**, v.108, n.1-2, p.101-12, 2005.

KAROLEMEAS, K.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; COOPER, R.; GOODCHILD, A.V.; CLIFTON-HADLEY, R.S.; CONLAN A.J.K.; MITCHELL, A.P.; HEWINSON, R.G.; DONNELLY, C. A.; WOOD, J.L.N.; MCKINLEY, T.J. Estimation of the *relative* sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. **Plos One**, v.7, e43217, 2012.

KARUPPUSAMY, S.; KIRBY, G.M.; MUTHARIA, L.; TRIPATHI, B.N. An update on *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis antigens and their role in the diagnosis of John's disease. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.120, 2019.

KELLY, R.F.; GONZALÉZ GORDON, L.; EGBE, N.F.; FREEMAN, E.J.; MAZERI, S.; NGWA, V.N.; TANYA, V.; SANDER, M.; NDIP, L.; MUWONGE, A.; MORGAN, K.L.; HANDEL, I.G.; BRONSVOORT, B.M.D.C. Bovine Tuberculosis *Antemortem* Diagnostic Test Agreement and Disagreement in a Naturally Infected African Cattle Population. **Frontiers in Veterinary Science**, v.9, 877534, 2022.

KGOADI, K.; BAJPAI, P.; IBEGBU, C.C. DKHAR, H.K.; ENRIQUEZ, A.B.; DAWA, S.;

CRIBBS, S.K.; RENGARAJAN, J. Alveolar macrophages from persons with HIV mount impaired TNF signaling networks to *M. tuberculosis* infection. ***Nature Communications*** v.16, 2397, 2025.

KHALID, H.; PIERNEEF, L.; VAN HOOIJ, A.; ZHOU, Z.; DE JONG, D.; TJON KON FAT, E.; CONNELLEY, T.K.; HOPE, J.C.; CORSTJENS, P.L.A.M.; GELUK, A. Development of lateral flow assays to detect host proteins in cattle for improved diagnosis of bovine tuberculosis. ***Frontiers in Veterinary Science***, v.10,1193332, 2023.

LARENAS-MUÑOZ, F.; SÁNCHEZ-CARVAJAL, J.M.; GALÁN-RELAÑO, Á.; RUEDAS- TORRES, I.; VERA-SALMORAL, E.; GÓMEZ-GASCÓN, L.; MALDONADO, A.; CARRASCO, L.; TARRADAS, C.; LUQUE, I.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, I.M.; GÓMEZ- LAGUNA, J. The Role of Histopathology as a Complementary Diagnostic Tool in the Monitoring of Bovine Tuberculosis. ***Frontiers in Veterinary Science***, v.9, 816190, 2022.

LITTLE, R.A. Negotiated Management Strategies for Bovine Tuberculosis: Enhancing Risk Mitigation in Michigan and the UK. ***Frontiers in Veterinary Science***, v.6, n.81, 2019.

LV, G.; WANG, H.; WANG, J.; LIAN, S.; WU, R. Effect of BLV Infection on the Immune Function of Polymorphonuclear Neutrophil in Dairy Cows. ***Frontiers in Veterinary Science***, v.8,737608, 2021.

LYASHCHENKO, K.P.; GREENWALD, R.; SIKAR-GANG, A.; SRIDHARA, A.A.; JOHNATHAN, A.; LAMBOTTE, P.; ESFANDIARI, J.; MAGGIOLI, M.F.; THACKER, T.C.; PALMER, M.V.; WATERS, W.R. Early Detection of Circulating Antigen and IgM-Associated Immune Complexes during Experimental *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. ***Clinical and Vaccine Immunology***, v.24, n.6, e00069-17, 2017.

MANDREKAR, J.N. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. ***Journal of Thoracic Oncology***, v.5, n.9, p.1315–1316, 2010.

MATSUO, T.; MATSUO, H.; OHARA, N.; MATSUMOTO, S.; KITaura, H.; MIZUNO, A.; YAMADA, T. Cloning and sequencing of an MPB70 homologue corresponding to MPB83 from *Mycobacterium bovis* BCG. **Scandinavian journal of immunology**, v.43, n.5, p.483-489, 1996.

MCCALLAN, L.; BROOKS, C.; COUZENS, C.; YOUNG, F.; MCNAIR, J.; BYRNE, A.W. Assessment of serological tests for diagnosis of bovine tuberculosis. Serological test performance for bovine tuberculosis in cattle from herds with evidence of on-going infection in Northern Ireland. **Plos One**, v.16, n.4, e0245655, 2021.

MENIN, Á.; FLEITH, R.; RECK, C.; MARLOW, M.; FERNANDES, P.; PILATI, C.; BÁFICA, A. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. **Plos One**, v.8, n.1, e53884, 2013.

MOENS, C.; SAEGERMAN, C.; FRETIN, D.; MARCHÉ, S. Field evaluation of two commercial serological assays for detecting bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v.159, p.125-132, 2023.

NDLOVU, H.; MARAKALALA, M.J. Granulomas and Inflammation: Host-Directed Therapies for Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v.7, n.434, 2016.

NIKI, M.; SUZUKAWA, M.; AKASHI, S.; NAGAI, H.; OHTA, K.; INOUE, M.; NIKI, M. KANEKO, Y.; MORIMOTO, K.; KURASHIMA, A.; KITADA, S.; MATSUMOTO, S.; SUZUKI, K.; HOSHINO, Y. Evaluation of humoral immunity to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens for correlation with clinical status and effective vaccine development. **Journal Immunology Research**, 2015, 527395, 2015.

NOGUEIRA, L.L.; CARDOSO, F.C.; MATTOS, A.M.; BORDIGNON, J.; FIGUEIREIDO, C. P.; DAHLSTROM, P.; FROTA, C.C.; SANTOS, C.N.D.; CHALHOUB, M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, H.C.; OLIVEIRA, S.C.; BARRAL NETO, M.; BÁFICA, A. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v.40, n.3, p.744-

753, 2010.

OIE, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Bovine Tuberculosis. 2018. Disponível em:

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVINE_TB.pdf.

ORME, I.M.; BASARABA, R.J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. **Seminars in Immunology**, v.26, n.6, p.601-609, 2014.

OSADA-OKA, M.; TATEISHI, Y.; HIRAYAMA, Y.; OZEKI, Y.; NIKI, M.; KITADA, S.; MAEKURA, R.; TSUJIMURA, K.; KOIDE, Y.; OHARA, N.; YAMAMOTO, T.; KOBAYASHI, K.; MATSUMOTO, S. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. **Microbiology and Immunology**, v.57, n.1, p.30-37, 2013.

PATHAK, L.; GAYAN, S.; PAL, B.; TALUKDAR, J.; BHUYAN, S.; SANDHYA, S.; YEGER, H.; BAISHYA, D.; DAS, B. Coronavirus Activates an Altruistic Stem Cell-Mediated Defense Mechanism that Reactivates Dormant Tuberculosis: Implications in Coronavirus Disease 2019 Pandemic. **The American Journal of Pathology**, v.191, n.7, p.1255-1268, 2021.

PLATTNER, B. L.; HUFFMAN, E. L.; HOSTETTER, J. M. Gamma Delta T-Cell Responses During Subcutaneous *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Challenge in Sensitized or Naive Calves Using Matrix Biopolymers. **Veterinary Pathology**, v.50, n.4, p.630-637, 2013.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinay Journal**, v.163, n. 2, p.115-127, 2002.

RODRIGUES, R.A.; MENESES, I.I.F.S.; JORGE, K.S.G.; SILVA, M.R.; SANTOS, L.R.; LILENBAUM, W.; ETGES, R.N.; ARAÚJO, F.R. False-Negative Reactions to the Comparative Intradermal Tuberculin Test for Bovine Tuberculosis. **Pesquisa Veterinária**

Brasileira, v.37, n.12, p.1380–1384, 2017.

SIMONNEY, N.; CHAVANET, P.; PERRONNE, C.; LEPORTIER, M.; REVOL, F.; HERRMANN, J.L.; LAGRANGE, P.H. B-cell immune responses in HIV positive and HIV negative patients with tuberculosis evaluated with an ELISA using a glycolipid antigen. **Tuberculosis**, v.87, n.2, p.109-122.

SMITH, K.; BERNITZ, N.; GOLDSWAIN, S.; COOPER, D.V.; WARREN, R.M.; GOOSEN, W.J.; MILLER, M.A. Optimized interferon-gamma release assays for detection of *Mycobacterium bovis* infection in African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.231, 110163, 2021.

SMITH, K.; KLEYNHANS, L.; WARREN, R.M.; GOOSEN, W.J.; MILLER, M.A. Cell-Mediated Immunological Biomarkers and Their Diagnostic Application in Livestock and Wildlife Infected with *Mycobacterium bovis*. **Frontiers in Immunology**, v.12, p.639605, 2021.

SOARES FILHO, P.M.; RAMALHO, A.K.; DE MOURA SILVA, A.; HODON, M.A.; DE AZEVEDO ISSA, M.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; MOTA, P.M.P.C.; SILVA, C.H.O.; DOS REIS, J.K.P.; LEITE, R.C. Evaluation of *post-mortem* diagnostic tests' sensitivity and specificity for bovine tuberculosis using Bayesian latent class analysis. **Research in Veterinary Science**, v.125, p.14-23, 2019.

STONE, D.M.; NORTON, L.K.; CHAMBERS, J.C.; MEEK, W.J. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. **Clinical Immunology**, v.96, n.3, p.280-288, 2000.

VAN HOOIJ, A.; TJON KON FAT, E.M.; RICHARDUS, R.; VAN DEN EEDEN, S.J.F.; WILSON, L.; DE DOOD, C.J.; FABER, R.; ALAM, K.; RICHARDUS, J.H.; CORSTJENS, P. L.A.M.; GELUK, A. Quantitative lateral flow strip assays as User-Friendly Tools to Detect Biomarker Profiles for Leprosy. **Scientific Reports**, v.6, 34260, 2016.

WALAZA, S.; COHEN, C.; TEMPIA, S.; MOYES, J.; NGUWENEZA, A.; MADHI, S.A.;

MCMORROW, M.; COHEN, A.L. Influenza and tuberculosis co-infection: A systematic review. *Influ. Other Respir. Viruses*, v.14, p.77–91, 2019.

WANG, Y.; LI, Q.; LIANG, G.; LI, H.; LI, Z.; GAO, T.; SONG, L.; HUANG, X.; PENG, D.; ZHANG, X. Preparation of a highly specific and sensitive monoclonal antibody against tilmicosin and its application in lateral flow immunoassay. **One Health Advances**, v. 1, 2023.

WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **Journal of comparative pathology**, v.133, n.4, p.223-34, 2005.

WATERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; VORDERMEIER, H.M.; GORMLEY, E.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; BANNANTINE, J.P.; STABEL, J.R.; LINSOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J.C. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in the Detection of Bovine Tuberculosis in Cattle. **Clinical And Vaccine Immunology**, v.18, n.11, p.1882-1888, 2011.

WATERS, W.R.; VORDERMEIER, H.M.; RHODES, S.; KHATRI, B.; PALMER, M.V.; MAGGIOLI, M.F.; THACKER, T.C.; NELSON, J.T.; THOMSEN, B.V.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; BRAVO GARCIA, D.M.; SCHOENBAUM, M.A.; CAMACHO, M.S.; RAY, J.S.; ESFANDIARI, J.; LAMBOTTE, P.; GREENWALD, R.; GRANDISON, A.; SIKAR-GANG, A.; LYASHCHENKO, K.P. Potential for Rapid Antibody Detection to Identify Tuberculous Cattle with Non-Reactive Tuberculin Skin Test Results. **BMC veterinary research**, v.13, n.1, p.164, 2017.

ZHAO, J.; SHIRATORI, B.; OKUMURA, M.; YANAI, H.; MATSUMOTO, M.; NAKAJIMA, C.; MIZUNO, K.; ONO, K.; ODA, T.; CHAGAN-YASUTAN, H.; ASHINO, Y.; MATSUBA, T.; YOSHIYAMA, T.; SUZUKI, Y.; HATTORI, T. Difference in Antibody Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in Japanese Tuberculosis Patients Infected with the Beijing/Non-Beijing Genotype. **Journal of Immunology Research**,

v. 2017, 4797856, 2017.