

636.058-08

RUSO

2003

ANTÔNIO CÂNDIDO DE CERQUEIRA LEITE RIBEIRO

DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM BÚFALOS
(Bubalus bubalis)

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor
em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina Veterinária
Preventiva e Epidemiologia

Orientador : Prof. Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2003



3-1748
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

24/03/04

1020504-01

R484d Ribeiro, Antônio Cândido de Cerqueira Leite, 1955-
Diagnóstico da tuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) / Antônio Cândido de
Cerqueira Leite Ribeiro. - 2003.
34 p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage

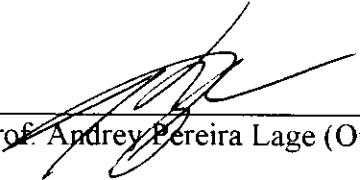
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Bibliografia: p.


1. Búfalo - Doenças - Teses. 2. Tuberculose em animais - Diagnóstico - Teses.
3. Epidemiologia - Teses. I. Lage, Andrey Pereira, 1966- II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 699 5

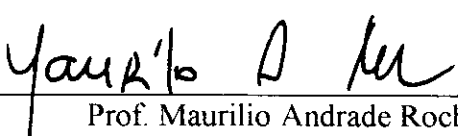
Tese defendida e aprovada em 22 de maio de 2003
Pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Andrey Pereira Lage (Orientador)




Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



Prof. Maurilio Andrade Rocha



Dr. Ademir de Moraes Ferreira



Dra. Isabella Bias Fortes Ferraz

A Miriam,

minha mulher,
cuja inteligência, que tanto respeito,
lhe permitiu compreender minhas ausências;
ao Daniel, à Lília,
meus filhos,
razão de ser da minha persistente luta,
ofereço, dedico, consagro
este trabalho.

Aos animais,
que nos servem até (n)a morte
sem que lhes demos sequer o direito de escolha,

meu agradecimento

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Andrey Pereira Lage pela escolha do tema, sugestões de rumo e orientações recebidas.

Ao Professor Elvio Carlos Moreira pela acolhida no curso

Aos meus irmãos e colegas de profissão Rômulo Cerqueira Leite e Romário Cerqueira Leite que tanto me estimularam e apoiaram incondicionalmente.

A minha irmã Cândida Leite Georgoboolus pelas correções de português.

Ao amigo e parceiro Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota que tanto ajudou na realização deste trabalho.

Ao amigo e grande incentivador Hermenegildo de Assis Villaça que não mediu esforços para que eu pudesse concluir este trabalho.

Ao Professor Francisco Carlos Faria Lobato pelo apoio, incentivo e ajuda no decorrer do curso.

Aos colegas de trabalho Armando da Costa Carvalho, Armando José Ribeiro dos Santos e Klinger Aparecido de Souza que ao longo deste período não pouparam esforços para me ajudarem nos trabalhos no Campo Experimental de Coronel Pacheco.

Aos amigos e colegas John Furlong, Limírio de Almeida Carvalho e Ademir de Moraes Ferreira pela ajuda e incentivo.

Ao Professor José Diomedes Barbosa que se dispôs a colaborar nos trabalhos de campo no Estado do Pará.

Aos amigos e colegas Carlos Magno Deugles, Luciano Bastos Lopes, Fabrício Rodrigues Amaral e Pedro Moreira Couto Mota que juntos no campo, pudemos executar de maneira descontraída e eficiente os trabalhos.

Ao amigo e colega José Henrique Bruschi pela sensibilidade e apoio no decorrer do curso.

A Eliana Silva, Heloisa Estêvão da Silva, Luciene Sudário Santos e Nilda Lucas Laurindo, da secretaria de pós-graduação que prontamente agilizaram todas os meios para a conclusão deste trabalho e pela fraterna convivência.

Aos produtores rurais proprietários dos rebanhos bubalinos que disponibilizaram seus animais para realização dos testes e abate sem os quais seria impossível realizar estas pesquisas.

Ao LARA/Pedro Leopoldo, pela disponibilização de laboratórios, técnicos e auxiliares na realização das provas laboratoriais.

À CAPES pelo auxílio financeiro na execução destas pesquisas.

À Embrapa a quem estou diretamente vinculado pela liberação do tempo de serviço dedicado a este projeto.

À todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta tese.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO GERAL	13

CAPÍTULO 1 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA O USO DA TUBERCULINIZAÇÃO INTRADÉRMICA EM BÚFALOS

INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E MÉTODOS	15
PREPARO DO INÓCULO SENSIBILIZANTE DE <i>M. bovis</i>	15
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
RESULTADOS	17
DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE LEITURA DA TUBERCULINIZAÇÃO EM BÚFALOS	17
DETERMINAÇÃO DO LOCAL DE INOCULAÇÃO	17
DISCUSSÃO	21
CONCLUSÕES	23

CAPÍTULO 2 DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BÚFALOS NO ESTADO DO PARÁ

INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	24
AMOSTRAGEM	24
TUBERCULINIZAÇÃO	25
COLETA DE AMOSTRAS PARA EXAME BACTERIOLÓGICO	25
BACTERIOLOGIA	25
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
RESULTADOS	26
ISOLAMENTO DE <i>MYCOBACTERIUM</i> SP DE BÚFALOS ABATIDOS APÓS TUBERCULINIZAÇÃO	26
ESTIMATIVA DE ESTABELECIMENTO DE UM PONTO DE CORTE PARA A TUBERCULINIZAÇÃO EM BÚFALOS	28
ESTIMATIVA DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA TUBERCULINIZAÇÃO EM BÚFALOS	28
FREQÜÊNCIA DE BÚFALOS REAGENTES À TUBERCULINIZAÇÃO EM ALGUMAS PROPRIEDADES DO ESTADO DO PARÁ	29
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1.	
DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA O USO DA TUBERCULINIZAÇÃO INTRADÉRMICA EM BÚFALOS	
TABELA 1 – Análise de variância aumento da espessura de pele em função do tempo após inoculação de PPD bovino em búfalos sensibilizados com <i>M. bovis</i>	17
TABELA 2 – Parâmetros da análise de regressão do aumento de espessura de pele após inoculação de PPD bovino em função do tempo de inoculação em búfalos sensibilizados com <i>M. bovis</i>	18
TABELA 3 – Análise de variância da regressão do aumento de espessura da pele após	

inoculação de PPD bovino em função do tempo de inoculação em búfalos sensibilizados com <i>M. bovis</i>	18
TABELA 4 – Análise de variância do local de inoculação de PPB bovino para em búfalos sensibilizados com <i>M. bovis</i>	20
TABELA 5 – Comparação das médias de aumento de espessura de pelo em locais de inoculação de PPB bovino pelo teste de Scott-Knott em animais sensibilizados com <i>M. bovis</i>	20
TABELA 6 – Análise de variância de região e altura de inoculação de PPD bovino em búfalos sensibilizados com <i>M. bovis</i>	21
TABELA 7 – Comparação das médias de aumento de espessura de pele em locais de inoculação de PPD bovino pelo teste Student-Newman-Keuls em animais sensibilizados com <i>M. bovis</i>	21

CAPÍTULO 2.

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BÚFALOS NO ESTADO DO PARÁ

TABELA 1 – Animais abatidos após tuberculinização por propriedade e município, Pará, 2001/2002.	25
TABELA 2 – Isolamento de <i>Mycobacterium</i> sp. de búfalos abatidos após tuberculinização, por propriedade, Pará, 2001/2002.	26
TABELA 3 – Isolamento de <i>Mycobacterium</i> sp. de búfalos abatidos após tuberculinização, por município, Pará, 2001/2002.	27
TABELA 4 – Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de diferença de espessura de pele após tuberculinização simples em búfalos em relação ao isolamento de <i>Mycobacterium</i> sp.	27
TABELA 5 – Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de diferença de espessura de pele após tuberculinização simples em búfalos em relação ao isolamento de <i>M. bovis</i> .	27
TABELA 6 – Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de diferença de espessura de pele após tuberculinização comparada em búfalos em relação ao isolamento de <i>Mycobacterium</i> sp.	28
TABELA 7 – Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de diferença de espessura de pele após tuberculinização comparada em búfalos em relação ao isolamento de <i>M. bovis</i> .	28
TABELA 8 – Frequência de búfalos reagentes à tuberculinização em propriedades do Estado do Pará, 2001/2002, segundo o critério de interpretação.	29

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.	
DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA O USO DA TUBERCULINIZAÇÃO INTRADÉRMICA EM BÚFALOS	
Figura 1 – Locais de inoculação de tuberculina	16
Figura 2 – Representação gráfica da regressão do aumento de espessura de pele (DB) (mm) após inoculação de PPD bovino, em função do tempo (h) em búfalos.	19

RESUMO

Dois grupos de búfalos foram previamente sensibilizados com *M. bovis* inativado e 60 dias após foram inoculados PPD bovina. Nos 9 animais do grupo 1, inoculados nas regiões cervical e escapular médias de ambos os lados dos animais, a medida da dobra de pele foi realizada nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h. Não houve diferença significativa entre os lados e o pico da reação ocorre em 77,3h. No grupo 2, os 16 animais foram inoculados nas regiões cervical (CE), escapular (ES), costal (CO), quarto traseiro (QT) e caudal (CD), nas alturas superior, média e inferior, perfazendo 23 inoculações de cada lado. A análise mostrou não haver diferença significativa entre os lados, entre as alturas de inoculação e entre as regiões ES, CO e QT, que foram superiores à CE e CD. No estado do Pará, 1061 búfalos foram tuberculinizados sendo que 128 animais abatidos tiveram os linfonodos retrofaríngeos, mediastínicos e mesentéricos e lesões sugestivas de tuberculose examinados bacteriologicamente. Foram isoladas 7 amostras de *M. bovis* e 13 amostras de micobactérias de crescimento rápido (MCR). As análises mostram que os critérios de interpretação da tuberculinização em búfalos precisam ser adequados à espécie e que os critérios sugeridos são superiores aos estabelecidos para bovinos. A infecção por MRC em búfalos e o número de propriedades com animais infectados por *M. bovis* é freqüente no Pará.

Palavras-chave: *M. bovis*, tuberculose, búfalos, diagnóstico, epidemiologia, Pará

ABSTRACT

Two groups of water buffaloes were sensitized with inactivated *M. bovis* and inoculated with bovine PPD 60 days thereafter. Group 1 (9 animals) were inoculated in the median cervical and shoulder regions of the animals and the skin was measured at 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h. There was no significant difference between sides and the peak reaction appeared at 77,3 h. In Group 2, the 16 animals were inoculated in upper, middle and lower cervical, shoulder, back, hind quarter, and caudal fold regions, totaling 23 inoculations at each side. There was no significant difference among sides, heights of inoculation and the shoulder, back and hind quarter regions that were more sensitive than cervical and caudal fold regions. In State of Pará, Brazil, 1061 water buffaloes were skin tested. Retropharyngeal, mediastinal and mesenteric lymph nodes from 128 slaughtered animals were submitted to bacteriology. Seven *M. bovis* and 13 fast-growing mycobacteria were isolated. Data analysis showed that criteria for skin test interpretation needed to be specific for buffaloes and the suggested criteria was superior than bovine criteria used for buffaloes. The infection with fast growing mycobacteria and the number of herds with animals infected with *M. bovis* is frequent in the State of Pará, Brazil.

Keywords: *M. bovis*, tuberculosis, skin test, diagnosis, epidemiology, Pará, Brazil

INTRODUÇÃO GERAL

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é um mamífero de produção mista de carne e leite que, embora ainda não devidamente considerado na pecuária mundial, tem despertado o interesse dos geneticistas, pecuaristas e pesquisadores da área de produção animal. Este tipo de animal deve merecer maior atenção, visto que, antes mesmo de ser submetido a qualquer programa de melhoramento genético cientificamente conduzido no Brasil, já apresenta resultados significantes na produção de leite (média de 6kg de leite/dia com alto teor de gordura) e carne (até 1300 kg de peso vivo).

O gado bubalino é rústico, com boa adaptação a diversos climas e solos, suportando temperaturas variadas, e sendo adaptável a terrenos altos ou baixos, secos ou alagadiços, com satisfatório desempenho reprodutivo. É originário da Ásia, onde se encontra a maior população, sendo metade dela na Índia. Na África, o Egito conta com o maior número de indivíduos. Na Europa, a Rússia, alguns países da ex-União Soviética e a Itália têm muitos rebanhos. Entre os países da América do Sul, o Brasil tem o maior rebanho.

Os búfalos foram trazidos para o Brasil, no início do século passado sendo considerados animais muito rústicos. Esse fato fez com que os proprietários procurassem criá-los, na maioria das vezes, em regime extensivo e em condições adversas extremas, o que fez com que alguns se tornem selvagens em algumas áreas de criação nas regiões Norte e Centro-Oeste do país. Os bubalinos chegaram pela Ilha de Marajó, região que se caracteriza por condições de manejo muito precárias e propriedades muito extensas, motivo pelo qual não foi dada a devida importância à espécie, em termos sanitários.

A partir das últimas décadas do século passado, cresceu o interesse na criação desses animais, principalmente em criatórios do Sudeste brasileiro e também, mas em menor número, no Nordeste.

Na região Norte, e em especial no Estado do Pará, alguns proprietários têm demonstrado maior interesse pelos bubalinos visando a produção de carne, embora já se perceba naquela região o interesse também pela produção de leite de búfalas. Na região Sudeste essa produção já é uma realidade, com existência de laticínios especializados na produção de derivados desse leite, sendo a mozzarella de búfalas bastante aceita, particularmente pelas pizzarias dos grandes centros. Ainda assim, não se encontra uma definição das prioridades sanitárias para os rebanhos bubalinos.

Em razão de sua grande rusticidade, propaga-se o conceito de que os bubalinos são resistentes a várias doenças que acometem os bovinos. Na verdade, os búfalos são susceptíveis à maior parte dos agentes patógenos que acometem os bovinos, como no caso do *Mycobacterium bovis*.

Vários são os entraves para uma abordagem eficaz do diagnóstico da tuberculose na bubalinocultura. Em primeiro lugar, não são conhecidos os indicadores de prevalência e incidência dessa doença nos rebanhos brasileiros. Embora trabalhos eventuais tenham sido realizados com vistas ao conhecimento desta realidade sanitária, eles são poucos e produzidos em regiões geográficas diversas. (Portugal *et al.*, 1971; Roxo, 1996; Roxo *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2002). Além disso, não se conhece de maneira adequada o papel que representam as micobactérias atípicas na tuberculose bubalina (Freitas *et al.*, 2001). Em segundo lugar, não foram ainda estabelecidos os parâmetros de diagnóstico necessários para a elaboração de uma tabela de interpretação

das reações alérgicas ao teste de tuberculização, bem como não se tem definido o tempo de leitura e o local de inoculação da tuberculina para búfalos. Na ausência dessas informações, tem-se utilizado no Brasil os parâmetros de leitura e locais de inoculação fixados para bovinos (Portugal *et al.*, 1971; Roxo, 1996; Roxo *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2002). O Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose – PNCEBT (Brasil, 2001) estabelece que os critérios de interpretação da tuberculização para bovinos sejam empregados para búfalos até que se defina um padrão específico para a espécie.

Visando contribuir para o estabelecimento dos parâmetros de realização da prova de tuberculização em búfalos, bem como conhecer a distribuição da tuberculose em

búfalos no Estado do Pará, o presente trabalho teve por objetivos:

- Determinar o tempo, após inoculação de tuberculina, em que há maior aumento de espessura na dobra da pele em búfalos;
- Identificar o local do corpo de búfalos com maior sensibilidade para a inoculação de tuberculina, visando a prova de tuberculização;
- Isolar amostras de *Mycobacterium* sp em amostras provenientes de búfalos e comparando com os resultados da tuberculização;
- Determinar a frequência de búfalos reagentes à tuberculização em alguns municípios do Estado do Pará.

CAPÍTULO 1

Determinação de Parâmetros para o Uso da Tuberculinização Intradérmica em Búfalos

INTRODUÇÃO

Desde o final do século XIX, com a descoberta da tuberculina por Koch, o diagnóstico da tuberculose vem sendo realizado por meio de testes alérgicos. A tuberculinização intradérmica, empregando o derivado protéico purificado (PPD) de *Mycobacterium bovis* ou *M. avium*, é o teste recomendado pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE) para o diagnóstico de tuberculose em bovinos com finalidade de trânsito internacional (Haagsma, 2000). Os parâmetros de realização da prova, como local de inoculação, tempo de leitura e ponto de corte, estão bem estabelecidos para essa espécie, existindo padrões internacionais para a realização da prova (Monaghan *et al.*, 1994; Haagsma, 2000; Brasil, 2001).

No Brasil, o recém lançado Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) visa o controle destas doenças em bovinos e bubalinos. No entanto, a interpretação da tuberculinização em búfalos se faz com base na tabela de interpretação da prova para bovinos (Brasil, 2001), apesar de vários autores sugerirem a necessidade da utilização de parâmetros específicos para a tuberculinização em bubalinos (Lall *et al.*, 1969; Portugal *et al.*, 1971; Francis *et al.*, 1978; Hein & Tomasovic, 1981; Bapat & Bangi, 1985; Sood & Gupta, 1989; Akhtar *et al.*, 1992; El Arian & Tripath, 1992, Kanameda & Ekgatat, 1995; Keet *et al.*, 1996; Roxo *et al.*, 1998, Keet *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2001, Mota *et al.*, 2002).

A tuberculose em búfalos causada pelo *M. bovis* já foi identificada em várias partes do mundo (Lall *et al.*, 1969; Francis *et al.*,

1978; Hein & Tomasovic, 1981; Bapat & Bangi, 1985; Sood & Gupta, 1989; El Arian & Tripath, 1992, Kanameda & Ekgatat, 1995; Keet *et al.*, 1996; Roxo, 1996, Keet *et al.*, 2000; Mota *et al.*, 2002), inclusive no Brasil, principalmente na Região Norte, onde se concentra a maior criação de bubalinos do país (Portugal *et al.*, 1971; Roxo, 1996; Roxo *et al.*, 1998, Mota *et al.*, 2002).

Roxo *et al.*, (1998) iniciaram os estudos para estabelecer os parâmetros específicos para o diagnóstico da tuberculose em búfalos pela tuberculinização. Estes autores observaram que as reações às tuberculinas são maiores em búfalos que em bois, e sugerem que a tuberculinização possa ser empregada no diagnóstico da tuberculose bubalina.

MATERIAL E MÉTODOS

PREPARO DO INÓCULO SENSIBILIZANTE DE *M. bovis*

Para a produção do inóculo sensibilizante utilizou-se culturas de *M. bovis* cepa AN5, semeadas em meio de Lowenstein-Jensen com incubação a 37°C, por 15 dias.

As colônias de *M. bovis* foram retiradas dos tubos de cultivo, depositadas em um gral previamente pesado e calculado o peso da massa úmida bacteriana. Adicionou-se ao gral, gradativamente, pedra pomes e parafina, na seguinte proporção: 100mg de massa bacteriana, 100mg de pedra pomes e 25mL de parafina líquida. Após completa homogeneização com auxílio de um pistilo, esta solução foi filtrada em gaze oito dobras, e inativada em vapor fluente (100°C) por 30

minutos. Após os controles de pureza e germes viáveis (Haagsma, 2000), o inóculo foi diluído para a concentração de 4 mg de massa bacteriana úmida / mL e envasado em frascos de 10ml.

O preparo do inóculo sensibilizante foi realizado no Setor de Tuberculose do LARA/MG, em cabine de segurança biológica classe II tipo A, com uso de equipamentos de proteção individual, seguindo-se normas de biossegurança para manipulação de organismos patogênicos (Fleming & Hunt, 2000).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Animais e Sensibilização

Foram utilizados dois grupos de búfalos mestiços machos, com 24 meses de idade; grupo 1, com 9 animais, e grupo 2, com 16 animais. Os animais foram mantidos a pasto, com suplementação mineral, durante todo o experimento. Cada animal foi sensibilizado com 2,5 mL (10 mg) do inóculo por via subcutânea, na região do peito.

Determinação do tempo de leitura

Os animais do grupo 1, 60 dias após a sensibilização foram inoculados com 0,1 mL de PPD bovina (LARA MG, MAPA, Pedro

Leopoldo, MG), sendo uma das inoculações na região cervical e outra na região escapular, na altura média, de ambos os lados.

A inoculação de PPD bovina foi realizada utilizando-se seringas automáticas de tuberculização (McLintock, CJ Hewlett & Son Ltd., Escócia) (Langenegger *et al.*, 1981). As áreas a serem inoculadas foram depiladas e a espessura da pele foi medida com cutímetro de mola (Hauptner, Solinger, Alemanha) antes da inoculação.

A leitura da diferença do aumento da espessura da dobra da pele foi calculada a partir da medida da pele antes da inoculação nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h.

Determinação do local de inoculação

Sessenta dias após a sensibilização, os animais do grupo 2 foram inoculados com 0,1 mL, por via intradérmica de PPD bovina (LARA MG, MAPA, Pedro Leopoldo, MG) por ponto, de cada lado, conforme mostrado na Fig. 1, mantendo-se uma distância de 20 cm entre os pontos de inoculação. Estes foram agrupados em regiões cervical, escapular, costal, quarto traseiro e caudal e, em função da altura do ponto inoculado, em altura superior, média e inferior (Fig. 1), para posterior análise.

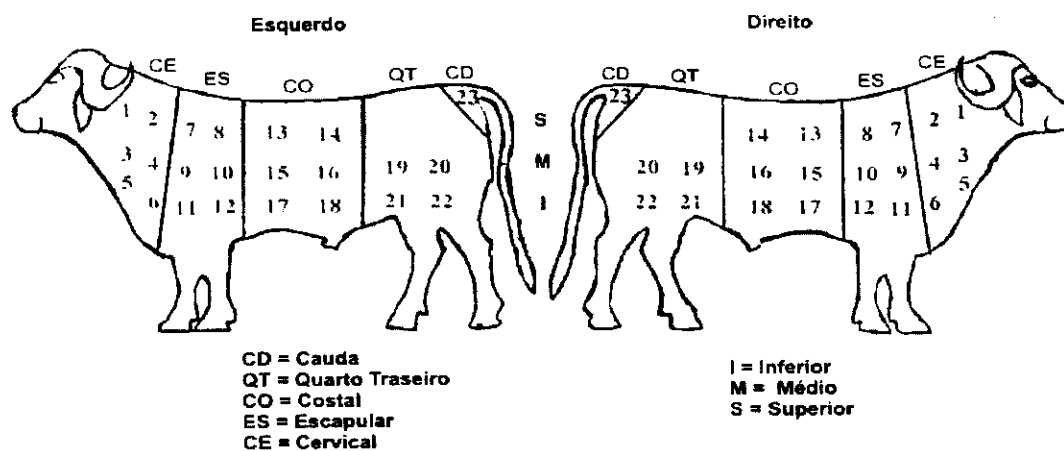


Fig. 1 – Locais de inoculação de tuberculina

Setenta e duas horas após a inoculação de PPD bovina todos os pontos foram medidos novamente, e a diferença de aumento da espessura da dobra de pele foi calculada.

Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado na análise da avaliação do tempo de leitura da tuberculização em búfalos, grupo 1, foi de parcelas subsubdivididas (Snedecor & Cochran, 1980). A análise de regressão foi realizada segundo as recomendações de Snedecor & Cochran (1980) e Sampaio (1998).

O delineamento experimental utilizado na análise da avaliação dos locais para inoculação de PPD bovina em função do lado do animal foi de parcelas subdivididas, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (Snedecor & Cochran, 1980).

Para avaliação das regiões e alturas de inoculação de PPD bovina foi utilizado um delineamento fatorial, retirando-se o efeito de animais. O teste de comparação de médias utilizado foi o de Student-Newman-Keuls (Snedecor & Cochran, 1980).

Todas as análises estatísticas foram executadas por intermédio do programa SAEG 8.0 (UFV, 1995) com $p \leq 0,05$ sendo considerado como significativo.

RESULTADOS

DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE LEITURA DA TUBERCULIZAÇÃO EM BÚFALOS

A análise de variância (Tab. 1) mostrou que, nos pontos inoculados médio cervical e médio escapular, não houve efeito de lado e de local de inoculação; entretanto, o efeito do tempo foi significativo.

TABELA 1 – Análise de variância aumento da espessura de pele em função do tempo após inoculação de PPD bovino em búfalos sensibilizados com *M. bovis*

Fontes de variação	GL ¹	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Sig
Total de Redução	17	791,7309	46,57241	4,36	0,0000
Animal	8	601,3614	75,17018	3,21	0,0021
Lado	1	3,120500	3,120500	0,13	*****
Erro (A)	8	187,2490	23,40612		
Total de Redução	18	381,8870	21,21594	1,60	0,0666
Local	1	17,11250	17,11250	0,97	*****
Lado*Local	1	82,01250	82,01250	4,64	0,0327
Erro (B)	16	282,7620	17,67263		
Total de Redução	144	1348,996	9,368028	0,28	*****
Tempo	4	326,6648	81,66619	8,89	0,0000
Lado*Tempo	4	2,328111	0,5820278	0,06	*****
Local*Tempo	4	64,15722	16,03931	1,75	0,1619
Lado*Local*Tempo	4	7,805000	1,951250	0,21	*****
Animal*Lado*Local*Tempo	32	66,36500	2,073906	0,23	*****
Erro (C)	96	881,6759	9,184124		

1 – GL – Graus de Liberdade

2 – Sig - Significância

A análise de regressão do aumento de espessura da pele após inoculação de PPD bovino em função do tempo de inoculação em búfalos sensibilizados com *M. bovis* (Tab. 2) estimou a equação de regressão, para o ponto médio cervical e escapular de

ambos os lados, em $AEDP = 2,918 + 0,201*\text{tempo} - 0,0013*\text{tempo}^2$, com um coeficiente de determinação (R^2) ajustado de 98,80%. A análise de variância do modelo mostrou ser este significativo (Tab. 3).

TABELA 2 – Parâmetros da análise de regressão do aumento de espessura de pele após inoculação de PPD bovino em função do tempo de inoculação em búfalos sensibilizados com *M. bovis*

Nome	Coefficientes	Desvios	T	Betas	Probabilidade
Constante	2,918330				
Tempo	0,201182	0,011232	17,9123	5,06875	0,0016
Tempo ²	-0,001296	0,000077	-16,9390	-4,79335	0,0017
R2	0,994005				
R2 ajustado	0,988010				

TABELA 3 – Análise de variância da regressão do aumento de espessura da pele após inoculação de PPD bovino em função do tempo de inoculação em búfalos sensibilizados com *M. bovis*

Fontes de variação	GL ¹	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probabilidade
Devido a Regressão	2	9,019623	4,509812	165,81	0,0060
Independente	2	0,054399	0,027199		

1 – GL – Graus de Liberdade

O tempo em que ocorre o máximo de aumento da espessura da dobra de pele, após a inoculação de PPD bovino em búfalos estimado pela equação, foi de 77,3 h (Fig 2); após este tempo houve diminuição

gradativa, com tendência a normalização da espessura da pele.

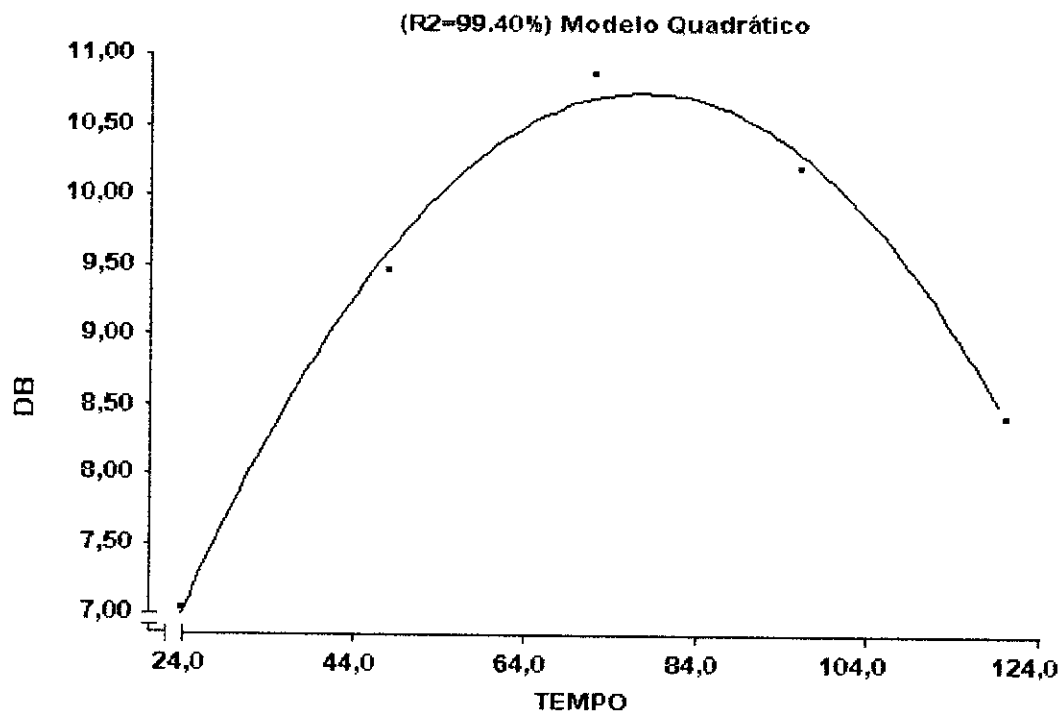


Fig. 2 – Representação gráfica da regressão do aumento de espessura de pele (DB) (mm) após inoculação de PPD bovino, em função do tempo (h) em búfalos.

DETERMINAÇÃO DO LOCAL DE INOCULAÇÃO

A análise dos 23 pontos de inoculação de cada lado dos animais mostrou não haver

diferença significativa entre os lados esquerdo e direito do animal em relação à resposta à tuberculinização (Tab. 4).

TABELA 4 – Análise de variância do local de inoculação de PPB bovino para em búfalos sensibilizados com *M. bovis*

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Sig
Total de Redução	31	2111.748	68.12090	9.92	0.0000
Animal	15	1889.557	125.9705	9.38	0.0000
Lado	1	20.68962	20.68962	1.54	0.2149
Erro (A)	15	201.5013	13.43342		
Total de Redução	704	4832.433	6.864251	0.10	*****
Local	22	629.5464	28.61575	4.64	0.0001
Lado*Local	22	128.6023	5.845557	0.95	*****
Erro (B)	660	4074.284	6.173158		

1 – GL – Graus de Liberdade

2 – Sig - Significância

Os dados de comparação das médias de aumento da espessura da dobra da pele nos nove animais do grupo 1 são apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5 – Comparação das médias de aumento de espessura de pelo em locais de inoculação de PPB bovino pelo teste de Scott-Knott em animais sensibilizados com *M. bovis*

Local	Médias	Comparações ¹
17	7,040625	A
19	6,987500	A
10	6,887500	A
9	6,765625	A
8	6,609375	A
15	6,521875	A
7	6,396876	A
22	6,381250	A
13	6,303125	A
11	6,284375	A
18	6,271874	A
12	6,165625	A
16	6,003125	A
3	5,875000	A
14	5,846875	A
21	5,431250	B
20	5,296875	B
5	5,240625	B
1	4,921874	B
2	4,703125	B
6	4,528124	B
4	4,521876	B
23	3,359375	C

1 – Médias com letras diferem significativamente

Os dados da análise de variância e das comparações das médias de aumento da espessura de pele em função da região e da

altura de inoculação de tuberculina são apresentados nas Tabela 6 e 7.

TABELA 6 – Análise de variância de região e altura de inoculação de PPD bovino em búfalos sensibilizados com *M. bovis*

Fontes de variação	GL ¹	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Sig
Total de Redução	23	1780.144	77.39754	12.82	0.0000
Animal	15	1475.820	98.38798	16.30	0.0000
Região de inoculação	2	276.0648	138.0324	22.86	0.0000
Altura de inoculação	2	8.656806	4.328403	0.72	*****
Região*Altura de inoculação	4	19.60215	4.900538	0.81	*****
Resíduo	552	3332.456	6.037058		

1 – GL – Graus de Liberdade

2 – Sig - Significância

TABELA 7 – Comparação das médias de aumento de espessura de pele em locais de inoculação de PPD bovino pelo teste Student-Newman-Keuls em animais sensibilizados com *M. bovis*

Região	Número de observações	Média	Comparações a 5% ¹
Escapular	192	6.5182	A
Costal	192	6.3313	A
Quarto Traseiro	128	6.0242	A
Cervical	192	4.9651	B
Prega Caudal	32	3.3594	C

1 – Médias com letras diferem significativamente

DISCUSSÃO

Para o eficaz estabelecimento de um programa de controle e erradicação de doenças são necessários métodos de diagnóstico sensíveis, específicos e adequados à execução das atividades do programa.

A tuberculinização intradérmica, apesar de ter sido introduzida como método diagnóstico da tuberculose humana e bovina na década de 1890, ainda se constitui no principal método de diagnóstico da

tuberculose bovina, sendo recomendada pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE) como teste para trânsito internacional de animais (Monaghan *et al.*, 1994; Haagsma, 2000).

Os critérios empregados para a realização e interpretação do teste de tuberculinização em búfalos são aqueles estabelecidos para bovinos (Brasil, 2001), o que, considerando-se as diferenças anatômicas e fisiológicas entre as espécies bovina e bubalina, pode influenciar negativamente na interpretação dos resultados e, conseqüentemente, no

estabelecimento de um programa de controle e erradicação da tuberculose bovina em búfalos.

A análise de parâmetros para a realização da prova de tuberculização em búfalos, empregando-se o modelo de animais sensibilizados com *M. bovis* inativado, proporcionou o início do estabelecimento de parâmetros específicos para a realização de tuberculização nesta espécie. Este modelo foi validado e amplamente empregado, e se mostrou bastante eficaz, para a determinação dos parâmetros da prova de tuberculização e aplicação de johnina em bovinos (Johnson, 1944; Wadley, 1948; Larsen *et al.*, 1950; Larsen *et al.*, 1957; Larsen *et al.*, 1960).

O aumento máximo de espessura de pele após inoculação de tuberculina em bubalinos ocorreu em 77,3h, semelhante ao que foi observado em bovinos (Monaghan *et al.*, 1994) e em outras espécies para reações de hipersensibilidade tardia (Barneston *et al.*, 1996; Tizard, 2002), nos quais é próximo de 72h. Estes resultados são similares aos obtidos por Roxo *et al.*, (1998), que efetuaram leituras até 72h após a inoculação de tuberculina e verificaram maiores aumentos de espessura da pele neste tempo. Entretanto, deve-se considerar que 77,3h é fração de tempo e, portanto, difícil de ser estipulado na rotina de diagnóstico em trabalhos de campo.

A utilização do tempo de leitura de 72h, que está dentro do intervalo de confiança do valor máximo calculado, facilitaria a padronização do tempo de leitura em um programa de controle para as espécies bovina e bubalina, pois em ambas as espécies a tuberculização poderia ser realizada 72h após a inoculação da tuberculina.

A constatação da ausência de diferença de aumento da espessura de pele, entre os lados esquerdo e direito, após a inoculação de PPD bovino em búfalos, indica que as

tuberculinizações podem ser realizadas de ambos os lados, conforme já definido para bovinos (Wadley, 1948, Larsen *et al.*, 1950; Larsen *et al.*, 1957; Larsen *et al.*, 1960; Mota, 2003). Do ponto de vista prático, isto permite que os exames sejam realizados mais facilmente, pois, na maioria das vezes, as instalações para bubalinos são muito rústicas, dificultando, em alguns casos, a inoculação da tuberculina em um dos lados do animal.

O estabelecimento de apenas três classes significativamente diferentes de pontos de inoculação de tuberculina pelo teste de Scott-Knott, não permitiu estabelecer o melhor desses pontos para inoculação de tuberculina na tuberculização em búfalos. Devido a ausência de diferenciação adequada entre os citados pontos de inoculação, optou-se por refazer a análise dos pontos de inoculação em função da região e da altura de inoculação da tuberculina.

O padrão de sensibilidade observado em búfalos, em relação à altura de inoculação da tuberculina, difere do estabelecido para bovinos, não havendo efeito da altura da inoculação da tuberculina. Isto permitiu que as análises do efeito de região de inoculação pudessem ser realizadas com todas as cinco regiões pré-definidas, pois nas alturas superior da região do quarto traseiro, e média e inferior da região caudal, não foi possível a inoculação da tuberculina devido a restrições anatômicas.

Além disto, a região cervical se mostrou menos sensível que as regiões escapular, costal e do quarto traseiro, sendo superior apenas à região caudal. Este padrão de sensibilidade difere de todos os estudos realizados em bovinos, onde há decréscimo de sensibilidade no sentido inferior e caudal do animal (Larsen *et al.*, 1950; Larsen *et al.*, 1957; Mota, 2003). A ausência de diferença significativa na sensibilidade a tuberculização entre as regiões escapular,

costal e quarto traseiro em búfalos facilita a realização da tuberculização nesta espécie, devido ao tipo de instalações utilizado, que na maioria das vezes dificulta a inoculação na região cervical, e ao fato de a pele da região costal ser mais solta, facilitando o manuseio da mesma pele para inoculação.

Do ponto de vista operacional, as regiões escapular, costal e do quarto traseiro, além de apresentarem maior sensibilidade à tuberculização, são de acesso mais fácil ao operador, facilitando a realização do teste e reduzindo o risco de acidentes que ocorrem em inoculações mais próximas à cabeça do animal. A utilização das regiões escapular, costal e do quarto traseiro na tuberculização em búfalos pode também melhorar o diagnóstico de tuberculose, em função de não se precisar utilizar corporais mais susceptíveis ao ataque de parasitos como *Dermatobia hominis* ou miíases, que ocorre comumente em animais criados extensivamente, como no caso da maioria dos rebanhos bubalinos.

Ainda que se possa observar diferenças estatísticas entre regiões corporais, todos os valores de aumento de espessura de pele encontrados, salvo para a região caudal, são superiores a 4 mm, e, na maioria das vezes, superiores a 5mm, que seriam os pontos de corte atualmente empregados no Brasil (Brasil, 2001) e propostos por Roxo *et al.*, 1998, respectivamente, podendo também ser empregados para o diagnóstico de tuberculose em búfalos.

A região caudal em búfalos se mostrou a menos sensível para a realização da prova de

tuberculização, o que já havia também sido observado em bovinos (Larsen *et al.*, 1950; Larsen *et al.*, 1957; Mota, 2003).

Roxo *et al.* (1998) afirmaram que a prega caudal era 1,8 vezes mais sensível que a região cervical para a realização da tuberculização em búfalos. Entretanto, estes autores somente realizaram a medida da espessura de pele 72h após a inoculação de PPD e não trabalharam com o aumento da espessura da pele devido à reação de hipersensibilidade tardia à tuberculina, como no presente trabalho.

CONCLUSÕES

Com relação ao diagnóstico de Tuberculose em búfalos, os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. O tempo de leitura da tuberculização em búfalos fica em torno de 77,3h;
2. Não há diferença significativa entre os lados do animal em relação a sensibilidade à tuberculina;
3. A inoculação de tuberculina deve ser realizada nas regiões escapular, costal ou do quarto traseiro, que apresentam sensibilidade equivalente;
4. Não há diferença em relação a altura de inoculação da tuberculina em búfalos;
5. A região caudal é a menos sensível para a inoculação de tuberculina em búfalos.

CAPÍTULO 2

Diagnóstico de tuberculose em búfalos no Estado do Pará

INTRODUÇÃO

No Brasil, a maior população de búfalos se concentra na Região Norte, principalmente no Estado do Pará, que possui mais da metade da população bubalina do país (IBGE, 2003). A exploração de búfalos nesta região é geralmente extensiva, mas, em razão de algumas características climáticas da região, observa-se uma mudança: na época das chuvas há uma grande concentração de animais em áreas restritas, devido às enchentes. Nas Regiões Sul e Sudeste, que concentram a segunda e terceira maiores populações de búfalos do país, respectivamente, o perfil da bubalinocultura vem mudando nos últimos anos, passando de uma exploração extensiva de produção de carne para uma exploração semi-intensiva ou mesmo intensiva de produção leiteira, com o estabelecimento de vários laticínios para a industrialização do leite de búfalas, principalmente para a produção de *mozzarella* (IBGE, 2003).

A tuberculose em búfalos vem se tornando uma preocupação crescente para técnicos e produtores de búfalos no Brasil e no mundo, devido aos prejuízos econômicos que acarreta e por apresentar riscos para a população humana consumidora de produtos de origem bubalina, principalmente pelas prevalências altas dessa doença em algumas regiões do país (Lall *et al.*, 1969; Portugal *et al.*, 1971; Francis *et al.*, 1978; Hein & Tomasovic, 1981; Bapat & Bangi, 1985; Sood & Gupta, 1989; El Arian & Tripath, 1992; Kanameda & Ekgatat, 1995; Keet *et al.*, 1996; Roxo, 1996; Roxo *et al.*, 1998; Keet *et al.*, 2000; Mota *et al.*, 2002).

Devido às dificuldades de diagnóstico, são escassos os dados disponíveis sobre a distribuição da tuberculose em bubalinos nos

rebanhos brasileiros, principalmente na região Norte, apesar de já haver sido confirmada a infecção pelo *M. bovis* em búfalos nos Estados do Amazonas e Pará (Roxo, 1996; Mota *et al.*, 2002). Além disso, poucas são as informações sobre a sensibilidade e especificidade da tuberculinização em búfalos (Roxo *et al.*, 1998) ou sua concordância com a histopatologia e bacteriologia (Hein & Tomosovic, 1981, Kanameda & Ekgatat, 1995). Mais ainda, a importância das reações inespecíficas, que são um problema no diagnóstico da tuberculose bovina (Langenegger *et al.*, 1981; Mota, 2003), ainda não foi bem avaliada (Kanameda *et al.*, 1999).

O objetivo do presente trabalho foi: (1) avaliar a frequência de tuberculose em búfalos de algumas propriedades do Estado do Pará; (2) isolar amostras de *Mycobacterium* sp de amostras provenientes de búfalos e comparar os resultados aos da tuberculinização.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

Foram tuberculinizados 1061 búfalos provenientes de 10 propriedades situadas nos municípios de Castanhal (1), Ipixuna (1), Marajó (2), Nova Timboteua (1) e Oriximiná (5) no Estado do Pará. Os animais, mestiços em sua maioria, eram criados extensivamente em pastagens nativas. Todos os animais adultos das propriedades foram amostrados entre setembro de 2001 e março de 2002.

TUBERCULINIZAÇÃO

A tuberculinação foi realizada segundo as recomendações citadas no capítulo 2 e de Langenegger *et al.* (1981). As tuberculinas PPD aviária e bovina (LARA MG, MAPA, Pedro Leopoldo, MG) foram inoculadas por via intradérmica na dose de 0,1 mL na região da escápula, anteriormente e posteriormente à crista acromiana, respectivamente, com cerca de 20 cm entre os pontos de inoculação.

A inoculação de PPD foi realizada utilizando-se seringas automáticas de tuberculinação (McLintock, CJ Hewlett & Son Ltd., Escócia) (Langenegger *et al.*, 1981). As áreas a serem inoculadas foram depiladas e a espessura da pele foi medida com cutímetro de mola (Hauptner, Solinger,

Alemanha) antes da inoculação e 72h após a inoculação.

Os resultados foram anotados e analisados segundo os parâmetros estabelecidos no Plano Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose – PNCEBT (Brasil, 2001).

COLETA DE AMOSTRAS PARA EXAME BACTERIOLÓGICO

Dos animais tuberculinizados nos municípios de Marajó, Nova Timboteua e Oriximiná foram selecionados 128 animais para abate (Tabela 1), dos quais foram coletadas lesões sugestivas de tuberculose e os linfonodos retrofaríngeos, mediastínicos e mesentéricos, para posterior exame bacteriológico.

TABELA 1 – Animais abatidos após tuberculinação por propriedade e município, Pará, 2001/2002.

Propriedade	Município			Total
	Marajó	Nova Timboteua	Oriximiná	
1	8	-	-	8
3	-	-	21	21
4	-	-	6	6
5	40	-	-	40
6	-	-	10	10
7	-	-	24	24
8	-	15	-	15
10	-	-	4	4
Total Global	48	15	65	128

BACTERIOLOGIA

No laboratório, das amostras coletadas retirava-se o tecido conjuntivo e adiposo seccionando-se as amostras em fragmentos de 2-3 mm de espessura. Das lesões retirava-se 10 g de material constituído da parte alterada e pequena quantidade de tecido normal. Dos linfonodos aparentemente normais retirava-se cinco fragmentos de

aproximadamente 2 g. O material da lesão e os linfonodos foram misturados, e essa mistura foi triturada em gral contendo areia.

A descontaminação foi realizada com ácido sulfúrico a 6%, na proporção de uma parte de material para seis partes de solução de ácido sulfúrico, por 30 min, incluindo 15 min de centrifugação a 500 g (Mota, 1985).

O sedimento foi lavado duas vezes com salina e depois semeado em dois tubos contendo meio de Stonebrink. As culturas foram incubadas a 37°C por oito semanas (CEPANZO..., 1988). Para a identificação das colônias isoladas foram empregadas provas bioquímicas segundo o Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO..., 1988).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O cálculo do intervalo de confiança e da frequência de animais reagentes à tuberculinização na amostra foi realizado segundo Bennett *et al.* (1991).

Os cálculos de sensibilidade e especificidade do teste foram feitos segundo Henken *et al.* (1997), utilizando-se o programa WinEpsicope versão 2.0 (Blas, Ortega, Frankena, Noordhuizen, Thrusfiled; Facultad de Veterinaria Zaragoza, Wagening University, University of, Edinburgh).

A estimativa do ponto de corte, privilegiando um teste com 90% de sensibilidade e 90% de especificidade, foi

realizada pelo método do "two-graph receiver operating characteristics - TG-ROC" (Greiner, 1996) utilizando o programa CMDT versão 1.0 β (Greiner & Briesofsky; Freie Universität Berlin).

RESULTADOS

ISOLAMENTO DE *MYCOBACTERIUM* SP DE BÚFALOS ABATIDOS APÓS TUBERCULINIZAÇÃO

Das misturas de material de lesão e linfonodos de cada animal foi possível isolar 20 amostras de *Mycobacterium* sp., sendo sete de *M. bovis* e 13 de micobactérias de crescimento rápido ("Mycobacteria other than tuberculosis" - MOTT). Dos três municípios que tiveram animais amostrados para a bacteriologia, somente foram isoladas amostras de *M. bovis* de duas propriedades do município de Oriximiná. Micobactérias de crescimento rápido foram isoladas de todas as propriedades amostradas, salvo uma propriedade do município de Oriximiná. A distribuição das amostras por propriedades e por municípios são apresentadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

TABELA 2 - Isolamento de *Mycobacterium* sp. de búfalos abatidos após tuberculinização, por propriedade, Pará, 2001/2002.

Propriedade	Isolamento			Total
	<i>M. bovis</i>	MOTT ¹	Negativo	
1	0	3	5	8
3	2	5	14	21
4	0	1	5	6
5	0	1	39	40
6	0	0	10	10
7	5	1	18	24
8	0	1	14	15
10	0	1	3	4
Total Global	7	13	108	128

1 - MOTT - "Mycobacteria other than tuberculosis"

TABELA 3 – Isolamento de *Mycobacterium* sp. de búfalos abatidos após tuberculinização, por município, Pará, 2001/2002.

Município	Isolamento			Total
	<i>M. bovis</i>	MOTT ¹	Negativo	
Marajó	0	4	44	48
Nova Timboteua	0	1	14	15
Oriximiná	7	8	50	65
Total Global	7	13	108	128

1 – MOTT – "Mycobacteria other than tuberculosis"

Os valores de média, desvio-padrão, mínimo e máximo das diferenças de espessura de pele observadas após tuberculinização simples e comparada em relação ao isolamento de *Mycobacterium* sp são apresentadas nas tabelas 4 a 7. Três animais, dos sete em que se isolaram amostras de *M. bovis*, apresentaram valores de diferença de

espessura de pele após tuberculinização comparada menor que 2,5 mm. Os dados das análises dos animais dos quais foram isoladas amostras de *M. bovis* são apresentados completos ou sem os dados dos três animais com diferenças de espessura de pele inferior a 2,5 mm.

TABELA 4 – Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de diferença de espessura de pele após tuberculinização simples em búfalos em relação ao isolamento de *Mycobacterium* sp.

Isolamento	N	Média (mm)	Desvio-padrão	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
<i>M. bovis</i>	7 (4)	10,8 (14,7)	6,6 (5,6)	1,8 (9,8)	21,9 (21,9)
MOTT	13	3,3	2,9	0,4	10,0
Negativo	108	3,4	3,0	0,0	18,4
Total	128	3,8	3,7	0,0	21,9

1 – MOTT – "Mycobacteria other than tuberculosis"

2 – Valores entre parênteses se referem a análise de dados dos animais com isolamento de *M. bovis*; e valores acima de 2,5 mm na tuberculinização comparada

TABELA 5 – Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de diferença de espessura de pele após tuberculinização simples em búfalos em relação ao isolamento de *M. bovis*.

Isolamento de <i>M. bovis</i>	N	Média (mm)	Desvio-padrão	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
Positivo	7 (4) ²	10,8 (14,7)	6,6 (5,6)	1,8 (9,8)	21,9 (21,9)
Negativo	121	3,4	3,0	0,0	18,4
Total	128	3,8	3,7	0,0	21,9

1 – MOTT – "Mycobacteria other than tuberculosis"

2 – Valores entre parênteses se referem a análise de dados dos animais com isolamento de *M. bovis* e valores acima de 2,5 mm na tuberculinização comparada

TABELA 6 – Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de diferença de espessura de pele após tuberculinização comparada em búfalos em relação ao isolamento de *Mycobacterium* sp.

Isolamento	N	Média (mm)	Desvio-padrão	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
<i>M. bovis</i>	7 (4) ²	7,4 (11,9)	6,5 (4,3)	0,1 (7,7)	17,1 (17,1)
MOTT ¹	13	0,7	3,3	-6,2	8,6
Negativo	108	1,1	3,1	-4,1	18,4
Total	128	1,4	3,6	-6,2	18,4

1 – MOTT – "Mycobacteria other than tuberculosis"

2 – Valores entre parênteses se referem a análise de dados dos animais com isolamento de *M. bovis* e valores acima de 2,5 mm na tuberculinização comparada

TABELA 7 – Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de diferença de espessura de pele após tuberculinização comparada em búfalos em relação ao isolamento de *M. bovis*.

Isolamento de <i>M. bovis</i>	N	Média (mm)	Desvio-padrão	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
Positivo	7 (4) ²	7,4 (11,9)	6,5 (4,3)	0,1 (7,7)	17,1 (17,1)
Negativo	121	1,0	3,1	-6,2	18,4
Total	128	1,4	3,6	-6,2	18,4

1 – MOTT – "Mycobacteria other than tuberculosis"

2 – Valores entre parênteses se referem a análise de dados dos animais com isolamento de *M. bovis* e valores acima de 2,5 mm na tuberculinização comparada

ESTIMATIVA DE ESTABELECIMENTO DE UM PONTO DE CORTE PARA A TUBERCULINIZAÇÃO EM BÚFALOS

A estimativa de ponto de corte para a tuberculinização simples em búfalos foi de $7,3 \pm 1,4$, com o intervalo de confiança 95% de 5,9 a 9,5. No caso da tuberculinização comparada, a estimativa do ponto de corte foi de $5,6 \pm 1,6$, com intervalo de confiança 95% de 4,3 a 9,7. Para o cálculo destas estimativas, foram empregados como resultados positivos à tuberculinização somente os resultados dos quatro animais dos quais se isolou *M. bovis*, e que apresentaram diferença de espessura de dobra de pele superior a 2,5 mm.

ESTIMATIVA DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA TUBERCULINIZAÇÃO EM BÚFALOS

Para os cálculos de sensibilidade e especificidade relativa da tuberculinização intradérmica em búfalos, a cultura foi empregada como padrão-ouro; e os animais com resultados inconclusivos na tuberculinização foram retirados da análise.

Utilizando-se o ponto de corte atualmente recomendado pelo PNCEBT para a tuberculinização, a sensibilidade e especificidade da tuberculinização simples foram de 85,71% (IC95%: 59,79 – 100,0%) e 50,00% (IC95%: 39,43 – 60,57%), respectivamente. Os valores de sensibilidade e especificidade para a tuberculinização

comparada foram de 66,67% (IC95%: 29,94 – 100,0%) e 87,50% (IC95%: 80,88 – 84,12%), respectivamente.

No cálculo de sensibilidade e especificidade da tuberculinização em búfalos, empregando-se o ponto de corte estimado neste experimento, foram considerados, como resultados inconclusivos à tuberculinização simples, os valores compreendidos entre 5,3mm e 7,2 mm; e à tuberculinização comparada, os valores entre 3,6 mm e 5,5 mm. Nesse caso, os valores de sensibilidade e especificidade da tuberculinização simples foram de 83,33% (IC95%: 53,51 – 100,0%) e 90,18% (IC95%: 84,67 – 95,69%), respectivamente, e os da tuberculinização comparada foram de 57,14% (IC95%: 20,48 – 93,80%) e 92,24% (IC95%: 87,37 – 97,11%), respectivamente.

FREQÜÊNCIA DE BÚFALOS REAGENTES À TUBERCULINIZAÇÃO EM ALGUMAS PROPRIEDADES DO ESTADO DO PARÁ

Para o cálculo de búfalos reagentes à tuberculinização, foram considerados os

animais positivos e inconclusivos no teste. Foram utilizados, no cálculo das freqüências, os pontos de corte recomendados pelo PNCEBT e os ponto de corte estimados no presente trabalho. Para a tuberculinização simples, o ponto de corte estimado foi de 7,3 mm, sendo considerados como inconclusivos os animais com reação entre 5,3 e 7,2 mm. Para a tuberculinização comparada, o ponto de corte estimado foi de 5,6 mm, sendo considerados como inconclusivos os animais com reação entre 3,6 e 5,5 mm.

Os valores de freqüência de búfalos reagentes à tuberculinização simples e comparada, com os diferentes pontos de corte, se encontram na tabela 8. Animais reagentes conclusivos e inconclusivos foram observados em todas as propriedades estudadas.

TABELA 8 – Freqüência de búfalos reagentes à tuberculinização em propriedades do Estado do Pará, 2001/2002, segundo o critério de interpretação.

Tuberculinização	n	Reagentes ²	Freqüência (%)	IC95% ¹	
				Mínimo	Máximo
TS – PNCEBT ³	1061	396	37,32	22,47	52,18
TS - 7,3-5,3 ⁴	1061	77	7,26	2,85	11,67
TC – PNCEBT ⁵	1061	86	8,11	2,81	13,40
TC - 5,6-3,6 ⁶	1061	39	3,68	0,00	7,35

1 – IC95% - Intervalo de confiança 95%

2 – Reagentes – animais com reação positiva ou inconclusiva à tuberculinização

3 – TS – PNCEBT – Tuberculinização simples – ponto de corte PNCEBT

4 – TS – 7,3-5,3 – Tuberculinização simples – ponto de corte de 7,3 mm para os positivos e de 5,3 mm para os inconclusivos

5 – TC – PNCEBT – Tuberculinização comparada – ponto de corte PNCEBT

6 – TC – 5,6-3,6 – Tuberculinização comparada – ponto de corte de 5,6 mm para os positivos e de 3,6 mm para os inconclusivos

DISCUSSÃO

Em estudos feitos em várias regiões sobre a sanidade do rebanho bubalino, a tuberculose é sempre evidenciada como uma das principais doenças de importância para a criação de búfalos no mundo (Hein & Tomasovic, 1981; Sood & Gupta, 1989; Samaha *et al.*, 1990; El-Arian & Tripathi, 1992; Rathore, 1998). Entretanto, apesar de sua importância, a tuberculose em búfalos é diagnosticada utilizando a tuberculinização intradérmica com a utilização dos parâmetros de interpretação estabelecidos para os bovinos (Monaghan *et al.*, 1994; Haagsma, 2000, Brasil, 2001), o que já foi evidenciado por alguns autores como sendo inadequado para a espécie bubalina (Kanameda & Ekgatat, 1995; Roxo, 1996; Roxo *et al.*, 1998, Kanameda *et al.*, 1999).

O isolamento de *Mycobacterium* sp de amostras de lesões e linfonodos de búfalos oriundos de propriedades do Estado do Pará, e sua comparação com os resultados da tuberculinização, propiciaram meios para o início de estudos para a determinação de parâmetros mais específicos para a tuberculinização na espécie.

O isolamento de *M. bovis* de duas de cinco propriedades do município de Oriximiná confirmam a presença de tuberculose nestas propriedades e, por conseguinte, no Estado do Pará.

Outro dado importante observado com o isolamento de *Mycobacterium* sp foi a ampla distribuição de micobactérias de crescimento rápido (MOTT) entre os rebanhos bubalinos amostrados. Estas micobactérias, que sensibilizam os animais infectados, podem interferir profundamente no diagnóstico alérgico da tuberculose (Mota, 1985; Monaghan *et al.*, 1994). O isolamento de *M. avium* de lesões sugestivas de tuberculose de búfalos abatidos no Estado do Pará já foi relatado por Freitas *et al.* (2001). Kanameda

et al. (1999) já alertavam para a falta de informações sobre a interferência da infecção por micobactérias de crescimento rápido no diagnóstico alérgico da tuberculose em búfalos. No presente trabalho isto pode ser evidenciado pela alta média de aumento de espessura de pele obtida na tuberculinização simples ($3,3 \pm 2,9$ mm), e pela observação de valores de até 10,0 mm observados na tuberculinização simples em alguns animais infectados por micobactérias de crescimento rápido. O encontro de um animal do qual se isolou micobactéria de crescimento rápido, com diferença de aumento de espessura de pele na tuberculinização comparada de 8,6 mm (Tabela 6), pode ter sido devido, além da infecção por micobactéria de crescimento rápido, à infecção por *M. bovis* que não pôde ser isolado no exame bacteriológico realizado, em razão do isolamento de *M. bovis* de outros animais da propriedade.

Três animais infectados por *M. bovis* apresentaram valores de diferença de aumento de espessura de pele na tuberculinização comparada inferiores a 2,5 mm, sendo que dois seriam considerados como negativos (0,1 mm e 1,3 mm) e um como inconclusivo (2,4 mm) ao teste, segundo a interpretação preconizada pelo PNCEBT (Brasil, 2001). O animal cujo valor de diferença de aumento de espessura de pele foi de 0,1 mm, apesar de infectado por *M. bovis*, apresentou valores muito baixos após a inoculação de PPD aviária e PPD bovina. Entretanto, mesmo não tendo sido observadas características clínicas de tuberculose avançada, como caquexia do animal, estes resultados indicam a presença de animal anérgico, que é um dos grandes problemas no diagnóstico e, conseqüentemente, no controle da tuberculose (Monaghan *et al.*, 1994; Thoen & Steele, 1995). O animal considerado como inconclusivo, e um animal considerado como negativo à tuberculinização comparada, também poderiam ser

classificados como anérgicos, mas eles podem ter tido contato com micobactérias de crescimento rápido, que não puderam ser isoladas no exame bacteriológico, visto que nas propriedades de onde se originavam havia isolamento de micobactérias de crescimento rápido em outros animais. Isto pode ter ocasionado os valores de diferença de espessura de pele observados após inoculação de PPD aviário (4,4 mm e 6,6 mm), o que resultou nos valores entre a diferença do aumento de pele após inoculação de PPD bovina e aviária observados.

Devido à dificuldade de interpretação dos resultados, os três animais infectados por *M. bovis*, mas com reações à tuberculização comparada inferiores a 2,5 mm, foram excluídos dos cálculos para se estimar um ponto de corte para a tuberculização em búfalos. A estimativa de ponto de corte empregando a bacteriologia dos outros 124 animais como padrão-ouro, de $7,3 \pm 1,4$ mm para a tuberculização simples, e de $5,6 \pm 1,6$ mm para a tuberculização comparada, apresentou valores muito superiores aos preconizados para bovinos e empregados para bubalinos no Brasil (Brasil, 2001) e em outros países (Monaghan et al, 1994; Thoen & Steele, 1995). Roxo et al. (1998) já haviam proposto valores de 10,0 mm para a tuberculização simples caudal, e de 5,0 mm para a tuberculização comparada em búfalos, baseado na média e intervalo de confiança do aumento de espessura de pele em búfalos sensibilizados com *M. bovis* e com *M. avium* mortos pelo calor.

Os valores de ponto de corte para a tuberculização estimados em búfalos no presente trabalho, mesmo tendo sido calculados a partir de um pequeno número de animais, principalmente de um pequeno número de animais infectados, confirma as indicações de que os parâmetros estabelecidos para a tuberculização em bovinos não são adequados para búfalos (Roxo et al., 1998; Kanameda et al., 1999).

Quando se analisa os valores de sensibilidade e especificidade da tuberculização em búfalos empregando os parâmetros recomendados pelo PNCEBT (Brasil, 2001) e os estimados no presente trabalho, observa-se um aumento de especificidade dos testes, mantendo-se níveis semelhantes de sensibilidade, quando se emprega os parâmetros estimados aqui. A baixa sensibilidade observada para a tuberculização comparada utilizando os dois parâmetros foi devida à presença dos três animais infectados por *M. bovis*, que apresentaram valores de diferença de aumento de espessura de pele após inoculação de PPD bovina e PPD aviária inferior a 2,5 mm, ocasionando resultados falsos positivos ao teste.

A frequência de animais reagentes à tuberculização varia em função do ponto de corte empregado no teste. As frequências de animais reagentes à tuberculização observadas nos diferentes testes e pontos de corte (Tabela 8) mostram diferentes valores médios. Entretanto, salvo os valores encontrados para a tuberculização simples interpretada conforme os parâmetros preconizados pelo PNCEBT (Brasil, 2001), os valores dos intervalos de confiança da média são semelhantes e se interpõem.

Não importando qual dos três outros critérios de interpretação tenha sido escolhido, e observando-se a sensibilidade e especificidade do teste, os valores de frequência encontrados permitem pressupor que a tuberculose está bastante difundida em búfalos no Estado do Pará. Das dez propriedades estudadas, foram encontrados animais reagentes positivos em oito, empregando-se o teste mais específico, a tuberculização comparada interpretada segundo os critérios estimados no presente trabalho. Nas duas outras propriedades, somente pequena percentagem de animais reagentes inconclusivos foram observados (2 em 54 e 3 em 32), o que poderia indicar que estas propriedades não possuíam animais

infectados por *M. bovis*. Isto indica que a frequência de propriedades com animais infectados por *M. bovis* na amostra é muito alta, pressupondo-se que a percentagem de propriedades com animais infectados no Estado do Pará também seja elevada.

Os parâmetros da tuberculização para búfalos estimados no presente trabalho, mesmo sendo altamente sugestivos da necessidade de modificação das chaves de interpretação atualmente em vigor, necessitam ser corroborados por estudos onde um número maior de animais sejam submetidos ao exame bacteriológico, principalmente com a inclusão de um número significativo de animais infectados por *M. bovis*.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. Os critérios de interpretação da tuberculização em búfalos precisam ser adequados à espécie;
2. A infecção por micobactérias de crescimento rápido é freqüente em búfalos criados no Estado do Pará;
3. A especificidade da tuberculização empregando os critérios estipulados no presente trabalho é superior aos valores encontrados para os testes empregando os critérios estabelecidos para bovinos;
4. Foi elevada a frequência do número de propriedades estudadas onde há animais infectados por *M. bovis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, S.; KHAN, M.I.; ANJUM, A.D. Comparative delayed cutaneous hypersensitivity in buffaloes and cattle: reaction to tuberculin purified protein derivative. **Buffalo J.** v. 1, p. 39-45, 1992.

BAPAT, J.A.; BANGI, M.I. Tuberculosis and Johnes disease amongst cattle and buffaloes in Maharashtra state. **Indian J. Ani. Sci.**, v. 55, p. 1022-1023, 1985.

BARNESTON, R.S., GAWKRODGER, D., BRITTON, W. Hypersensitivity – type IV. In: ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Immunology**. London, Mosby, 1996. p. 25.1 – 25.12.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 2 de 10 de janeiro de 2001. Ministério da Agricultura, Brasil, 2001.

CEPANZO. Centro Panamericano de Zoonosis. **Bacteriologia de la Tuberculosis**. Buenos Aires, 1988. 63p. (série de monografias científicas y técnicas nº 11/Rev. I).

EL-ARIAN, M.N.; TRIPATHI, V.N. Studies on the disposal patterns in Murrah buffaloes. **Buffalo Bull.**, v.11, 1992.

FLEMING, D.O., HUNT, D.L. **Biological safety: principles and practices**. Washington, USA, ASM. 2000

FRANCIS, J.; SEILER, R.J.; WILKIE, I.W.; OBOYLE, D.; LUMSDEN, M.J.; FROST, A.J. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. **Vet. Record**, v.4, p. 420-425, 1978.

FREITAS, J.A.; PANETTA, J.C.; CURCIO, M.; UEKI, S.Y.M. Isolamento de cepas de micobacterium avium em búfalos abatidos para consumo. **Rev. Saúde Pública**, v. 35, p.315-317, 2001.

GREINER, M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): update version supports optimisation of cut-off values that minimise overall misclassification costs. **J. Immunol. Methods**, v.191, p.93-94, 1996.

- HAAGSMA, J. Bovine Tuberculosis. In: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**. 4 ed. Paris: Office International des Epizooties, p. 359 – 370, 2000.
- HEIN, W.R.; TOMASOVIC, A.A. An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. **Aust. Vet. J.**, v. 57, 1981.
- HENKEN, A.M., GRAAT, E.A.M., CASAL, J. Measurement of disease frequency. In: NOORDHUIZEN, J.P.T.M., FRANKENA, K., HOOFD, C.M. van der, GRAAT, E.A.M. **Application of quantitative methods in Veterinary Epidemiology**. The Netherlands: Wageningen Pers, 1997. Cap. IV, p.63-98.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=1>) Acessado em 19.05.2003.
- JOHNSON, H.W. Studies on johnin III. Multiple testing on sensitizes cattle as a method of studying johnin potency. **Am. J. Vet. Res.**, v.9, p.179-188, 1948.
- KANAMEDA, M.; EKGATAT, M. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Trop. Anim. Health Prod.** v. 27, p. 227-228, 1995.
- KANAMEDA, M.; EKGATAT, M.; WONGKASEMJIT, S.; SIRIVAN, C.; PACHIMASIRI, T.; KONGKRONG, C.; BHCHAPHAN, K.; BOONTARAT, B. An evaluation of tuberculin skin tests used to diagnose tuberculosis in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Prev. Vet. Med.**, v. 39, p. 129-135, 1999.
- KEET, D.F.; KRIEK, N.P.J.; PENRITH, M.L.; MICHEL, A.; HUCHZERMEYER, H. Tuberculosis in buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruguer National Park: Spread of the disease to other species. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 63 p.239-244, 1996.
- KEET, D.F.; KRIEK, N.P.J.; BENGIS, R.G.; GROBLER, D.G.; MICHEL, A. The rise and fall of tuberculosis in a free-ranging baboon troop in the Kruger National Park. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 67 p.115-122, 2000.
- LALL, J.M.; SINGH, G.; GUPTA, B.R.S. Incidence of tuberculosis among cattle and buffaloes in India. **Indian J. Ani. Sci.** v. 39, p.51-58, 1967.
- LANGENNEGER, J, LANGENNEGER, CH, MOTA, PMPC, LEITE, RC. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.4, p145-149, 1981.
- LARSEN, A.B., GROTH, A.H., JOHNSON, H.W. Allergic response to johnin and tuberculin of various skin regions of cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 11, p. 301-303, 1950.
- LARSEN, A.B., BAISDEN, L.A., MERKAL, R.S., MORRIS, M.J. Methods of injecting tuberculin in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 18, p. 546-549, 1957.
- LARSEN, A.B., VARDAMAN, T.H., HARVEY, W.R. Tuberculin reaction size as related to the number of simultaneous tuberculin injections. **Am. J. Vet. Res.**, v. 21, p. 1075-1077, 1960.
- MONAGHAM, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology** v.40, p. 111-124, 1994

- MOTA, P.M.P.C. **Estudo da esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas da tuberculose bovina.** Belo Horizonte. Escola de Veterinária da UFMG. 1985. 70 p. (Dissertação de mestrado).
- MOTA, P.M.P.C. **Tuberculose bovina: diagnóstico e controle.** Belo Horizonte. Escola de Veterinária da UFMG. 2003. 72 p. (Tese de doutorado).
- MOTA, P.M.P.C., LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; LAGE, A.P., PARREIRAS, P.M., LEITE, R.C. Ocorrência de rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis* - Lineus, 1758) no município de Parintins, Amazonas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 54, p. 441-443, 2002.
- PORTUGAL, M.A.S.C. GIORGI, W.; SIQUEIRA, P.A. Ocorrência de Tuberculose em rebanho Bubalino (*Bubalus bubalis* var *Bubalis* Linneus, 1758) no Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol. S.Paulo**, v. 38, p.231-238, 1971.
- RATHORE, B.S. An epidemiological study on buffalo morbidity and mortality based on four year observations on 18630 buffaloes maintained at 28 livestock farms in India. **Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 43-49, 1998.
- ROXO, E. **Avaliação da resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina em bubalinos (*Bubalus bubalis*).** São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 1996. 55 p. (Tese de doutorado).
- ROXO, E.; VASCONCELLOS, S.A.; PINHEIRO, S.R.; BARUSELLI, F.S.; MACRUZ, R.; LEITE, C.Q.L. Evaluation of tuberculin skin reaction in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Arq. Inst. Biol. S. Paulo**, v. 65, p.81-92, 1998.
- SAMAHA, H.; MANDOUR, M.; ALI, A. The effect of housing system on the prevalence of tuberculosis, brucellosis and mastitis. **Assiut Vet. Med. J.**, v. 22, p. 122-127, 1990.
- SAMPAIO, I.B.M., **Estatística aplicada a experimentação animal**, Belo Horizonte, Brasil, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.
- SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. **Statistical methods**, Iowa, Ed. The Iowa State University Press, 1980. 507p.
- SOOD, N.; GUPTA, P.P. Pulmonary mycosis, tuberculosis and echinococcosis in Indian water buffaloes. **Indian J. Ani. Sci.**, v. 59, p.648-651, 1989.
- THOEN, C.O. & STEELE, J.H. (Ed). **Mycobacterium bovis infection in animals and humans.** Iowa State University, Ames, 1995, 355 p
- TIZARD, I.R. **Veterinary immunology.** Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2002. 531p.
- WADLEY, F.M. Experimental designs in comparison of allergens on cattle. **Biometrics**, v. 4, p. 100-108, 1948.