

Donald R

JOSÉ MARIA WIEST

AVALIAÇÃO DE ALGUMAS QUALIDADES DAS  
TUBERCULINAS DE USO ANIMAL NO BRASIL

ORIENTADOR:

Prof. Dr. José Britto Figueiredo

Tese apresentada ao DEPARTAMENTO  
DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVEN-  
TIVA da Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Ge-  
rais, como exigência regulamen-  
tar para a obtenção do grau de:

MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA

Belo Horizonte  
Minas Gerais - Brasil

-1972-

TESE APRESENTADA EM: 03/07/1972

BANCA EXAMINADORA:

as.) Prof. Dr. José Britto Figueiredo

as.) Prof. Dr. Osmane Hipólito

as.) Prof. Dr. Ronaldo Reis

À minha mãe, pelo estímulo.  
A Silvio Tôrres, pelo exemplo.

O autor agradece

ao Professor Dr. José Britto  
Figueiredo, pela segura e  
competente orientação,

a todos que, direta ou indi-  
retamente, colaboraram no  
presente trabalho de tese.

Ao Professor Doutor Leônidas Machado Magalhães, Coordenador dos Cursos de Mestrado na Escola de Veterinária e Diretor Executivo do Conselho de Pós-Graduação da UFMG., por ocasião da primeira tese do Curso de Mestrado na área de Medicina Veterinária Preventiva, homenagem dos corpos docente e discente.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

JOSE MARIA WIEST, nascido a 14 de agosto de 1944 em Barra do Ribeiro, Guaíba, Rio Grande do Sul, filho de João José Wist e Lúcia Thereza Wagner Wist, concluiu o Curso de Veterinária da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 14 de dezembro de 1966, recebendo a Bolsa "Lei Brossard" do ano, oferecida pelo Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Oficial da Reserva de 2ª Classe do Exército Brasileiro, prestou serviço militar junto ao Estabelecimento Regional de Subsistência da 3ª Região Militar do III Exército, em Porto Alegre, R.G.S., como 2º Tenente do Serviço de Veterinária, de 31/01/1967 a 31/03/1968. Bolsista do Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico na qualidade de pesquisador-hóspede, junto ao Instituto de Microbiologia e Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos, da Universidade Ludwig Maximilian de Munique, Alemanha Ocidental, de 01/05/1968 a 30/04/1969. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul com Bolsa Especial de Pesquisa junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal do R.G.S. de 01/05/1969 a 31/12/1970. Auxiliar de Ensino contratado pela Universidade Federal do R.G.S. em regime de tempo integral e dedicação exclusiva, lotado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva a contar de 20/04/1970. Orientador de bolsas de iniciação, aperfeiçoamento bem como colaborador em bolsas especiais de pesquisa, junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do R.G.S. e à Câmara de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal do R.G.S. a partir de 01/05/1969. Em Curso de Pós-graduação Mestrado na área de Medicina Veterinária Preventiva junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G., a partir de 01/03/1971.

Este trabalho foi executado com suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, processo número 126 de 1971.

Agradecemos à CARL ZEISS,  
Oberkochen, W. G., a im-  
pressão da presente tese.

## ÍNDICE

xi

CAPÍTULO	I: INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO	II: LITERATURA .....	4
CAPÍTULO	III: MATERIAL E MÉTODOS .....	18
CAPÍTULO	IV: RESULTADOS .....	32
CAPÍTULO	V: DISCUSSÃO .....	45
CAPÍTULO	VI: CONCLUSÕES .....	51
CAPÍTULO	VII: RESUMO .....	54
CAPÍTULO	VIII: SUMMARY .....	56
CAPÍTULO	IX: ZUSAMMENFASSUNG .....	58
CAPÍTULO	X: BIBLIOGRAFIA .....	60



## I. INTRODUÇÃO

O planejamento em ações de saúde prevê, após a fixação das prioridades, a instrumentalização dos recursos disponíveis e a eleição de técnicas adequadas, visando o atendimento das necessidades propostas em termos de benefícios a serem alcançados, através de controle de doenças e incremento da produtividade, tanto na espécie humana como animal.

Na área da saúde, talvez com maior ênfase, constatamos a amplitude, a multiplicidade e a importância crescente de necessidades, enquanto que os recursos disponíveis são escassos, na maioria das vezes.

No contexto dos problemas de saúde animal, em âmbito nacional, mesmo enfatizada sua característica de zoonose, até o presente momento a tuberculose não está incluída nas doenças de interesse prioritário.

Inúmeras justificativas são apresentadas para tal atitude, como a prevalência maior de outras doenças embora não zoonoses mas de maior significado econômico, a carência de recursos humanos, materiais e financeiros, a cotação insuficiente dos produtos pecuários, o baixo grau de cultura das populações expostas ao risco e outras de menor importância.

É evidente que a falta de diagnóstico preciso da extensão dos problemas sanitários, sociais e econômicos acarretados pela doença em nosso meio, fundamentado em estudos epidemiológicos concretos, contribui para a carência de motivação e interesse no planejamento e execução de ações visando controlar ou mesmo erradicar a tuberculose animal, atendendo principalmente a preservação da saúde humana, como já o fizeram inúmeros outros países.

Todas as ações orientadas no sentido do controle ou da erradicação da tuberculose humana de origem animal ou da tuberculose nos rebanhos, baseiam-se no diagnóstico da doença através das provas de tuberculinização. Mesmo a moderna aplicação de quimioprofilaxia em rebanhos de áreas com alta endemicidade, não dispensa a tuberculinização na avaliação dos êxitos alcançados.

A tuberculina, como principal recurso diagnóstico em tuberculose animal, deve merecer conveniente instrumentalização. Pela adoção dos métodos e técnicas adequados ao alcance dos objetivos propostos em termos de nossas necessidades, chegaremos a controlar ou erradicar o mal de nossas populações.

O presente trabalho visa avaliar algumas qualidades das tuberculinas de uso animal no país e assim contribuir à sua instrumentalização conveniente, como recurso técnico imprescindível no planejamento e execução de futuras ações visando o problema da tuberculose, animal e humana, em nosso meio.

De modo específico, foram avaliadas as seguintes qualidades:

1. excesso de preservativos;
2. esterilidade;
3. toxicidade;
4. título bioquímico;
5. título biológico.

## II. LITERATURA

Os objetivos do presente trabalho poderão, a nosso ver, melhor serem compreendidos, após revisão ampliada da literatura especializada. Ao lado dos objetivos específicos, nos parece perfeitamente indicado razoável pesquisa bibliográfica sobre técnicas de produção e comportamento animal frente a reações alérgicas, no caso presente, tuberculinização.

Os primeiros estudos sobre tuberculina foram realizados por Robert Koch em 1890, segundo SCHLIESSER (1966) e constituem-se, indiscutivelmente, seu maior mérito como pesquisador.

No início, o autor tencionava aplicar sua tuberculina como medida medicamentosa curativa, porém o produto revelou-se ineficaz como tal, mas de grande utilidade no diagnóstico da tuberculose.

KOCH (1891) embora não avaliando de inteiro a importância e a repercussão de seu trabalho, descrevia com clareza a reação desencadeada por sua tuberculina, expressando-se da seguinte maneira: "a pele de um cobaio tuberculoso tem comportamento distinto da pele de um cobaio normal, quando lhes injetamos, subcutaneamente, tuberculina". O autor segue descrevendo suas observações, sugerindo conclusões e a aplicação terapêutica de seu produto.

É digno de admiração seu trabalho, principalmente se nos reportarmos às condições de desenvolvimento técnico-científico de sua época.

A tuberculina e KOCH (1891), também conhecida como tuberculina "velha" ou tuberculina "velha de Koch", é aquela pro

duzida em caldo glicerinado, inativada pelo calor e reduzida ao décimo de seu volume por evaporação, possuindo ao final cerca de 50% de glicerina. O próprio autor, em seus trabalhos originais, já previa "que outras substâncias acompanhavam a tuberculina, como sais minerais, substâncias corantes e outras substâncias extrativas desconhecidas. A substância ativa é insolúvel em álcool absoluto, mas não pode ser extraída totalmente pura por este processo, pois outras substâncias extrativas desconhecidas, também insolúveis em álcool absoluto, sempre as acompanham".

Sérios inconvenientes são atribuídos a este tipo de tuberculina, como a sensibilidade e especificidade baixas, entre outros, em sua maioria oriundos da taxa de proteína inespecífica incorporada ao produto durante o preparo.

A W.H.O. (1968) concede, internacionalmente, à tuberculina "velha de Koch" o nome de Tuberculinum pristinum.

DORSET (1934) descreveu novo tipo de tuberculina, de meio sintético, concentrada pelo calor, "heat concentrated synthetic medium", com sigla "H.C.S.M.", erroneamente designada por tuberculina "sintética". Contém todos os produtos metabólicos do desenvolvimento do bacilo tuberculoso e ainda variedades quantitativas de polisacarídeos, ácido nucleico, glicerol e proteínas. O nitrogênio protéico presente equivale, aproximadamente a um décimo do nitrogênio total. As impurezas presentes, à parte dos derivados de carne, não participantes do meio sintético, são similares às presentes na tuberculina "velha de Koch". Desta forma, ainda podem influir na especificidade e na sensibilidade de suas reações, segundo STABLEFORTH & GALLOWAY (1959).

Para DORSET (1934) porém, sua tuberculina era "não somente um produto muito puro sob o ponto de vista químico mas também, julgado sob ponto de vista prático, mais potente e exequível que a "velha tuberculina de caldo glicerinado".

SEIBERT (1934) desenvolveu a tuberculina "de derivados protéicos purificados", conhecida por "P.P.D.", sigla de "purified protein derivatives tuberculin", referindo-se esta ao produto obtido do crescimento do bacilo tuberculoso ou outros bacilos álcool-ácido resistentes, em meios de cultura especiais, livres de proteína animal, que permitam a exclusão de toda proteína inespecífica, obtendo-se como produto final somente a tubérculo-proteína produzida pelo metabolismo bacilar.

O princípio ativo desta tuberculina foi isolado e pu-

rificado através de precipitação por ácido tricloro-acético, a partir de uma solução de tuberculina pré-aquecida, produzida em meio sintético, posteriormente concentrada e lavada por ultracentrifugação.

Seus caracteres físicos e químicos indicam ser um derivado protéico, de baixo peso molecular, não antigênico e portanto não induzindo a produção de anticorpos ou sensibilização, mas altamente potente e específico nos testes cutâneos, ao contrário das proteínas de maior peso molecular, contidas em outras tuberculinas, as quais são tipicamente substâncias antigênicas.

A W.H.O. (1968) concede, internacionalmente, à tuberculina "de derivados protéicos purificados" o nome de Derivatium proteinosum purificatum tuberculinum.

LESSLIE (1961 e 1967) considera a tuberculina "P.P.D." quimicamente mais pura que a tuberculina "velha de Koch", de preparo mais econômico e podendo sua potência ser padronizada mais facilmente.

Outros autores pretenderam descrever novos tipos de tuberculina, produzidos a partir do método "P.P.D.". Assim o fizeram BRETEY (1951) precipitando a tubérculo--proteína por ácido salicílico; BIRKHAUG e cols. (1952) por precipitação fracionada por álcool e BUXTON & GLOWER (1939) por precipitação pelo sulfato de amônio. Na realidade são variações da própria tuberculina "de derivados protéicos purificados".

BILLAUELLE (1959) desenvolveu a "endotuberculina", um complexo lipo-polisacarídico-protéico, obtido de bacilos tuberculosos vivos, através de congelamento dos mesmos a  $-56^{\circ}\text{C}$  e reaquecimento a  $40^{\circ}\text{C}$ , por vinte vezes seguidas.

GULD e cols. (1965) tenderam criar novo tipo de tuberculina através da precipitação por ácido e posteriormente por álcool de concentrado não aquecido, obtido por ultracentrifugação de cultura de bacilos tuberculosos do tipo humano. O sobrenadante é o produto final, utilizado como tuberculina. Os autores observaram seu emprego na espécie humana e declaram que o produto induz a bem menor número de reações não-específicas, comparado com as tuberculinas comumente empregadas.

GRYS (1967) desenvolveu outro tipo de tuberculina "de derivativos termoestáveis", conhecida como "T.T.D.", sigla de "tubercle thermostable derivative". O autor a descreve como fração da parede celular do bacilo tuberculoso. Utilizou o ti-

po humano do bacilo de Koch, morto pelo calor, extraíndo a fração citada quimicamente ou por digestão através de enzimas. O "T.T.D." purificado demonstrou-se resistente à digestão por pepsina mas suas propriedades antigênicas baixaram em 50% pela digestão por tripsina. Quimicamente trata-se de um complexo protéico polisacarídico-lipídico, contendo 0,4% de fósforo na porção não-lipídica. O produto foi aplicado em bovinos tubercu-losos com sucesso positivo.

ARKHIPOV e cols. (1967 e 1968) demonstraram o emprego das radiações gama, por cobalto-60, na produção de tuberculina "velha de Koch" e de tuberculina "P.P.D.", em substituição à esterilização das culturas iniciais em autoclave. Após a filtração e envasamento das tuberculinas, sob vácuo, novamente em pregaram radiações gama a fim de obter esterilização dos germes de eventual invasão secundária. Coelhos testados intensiva-mente com tuberculina "gama" não demonstraram excesso de cobalto-60, estrôncio radioativo e potássio-40. Os resultados da aplicação desta tuberculina em bovinos corresponderam com os achados "post mortem". A atividade biológica da tuberculina "gama" não declinou após trinta e um meses de armazenamento.

O emprego de ultrassom na produção de tuberculinas, para a obtenção da desintegração bacteriana, foi demonstrado por GALABOV & JANACKOVA (1960) e por ARKHIPOV e cols. (1967). O período de exposição das massas bacterianas ao ultrassom era de cinco a vinte minutos, com subsequente extração das proteí-nas. Testes posteriores em cobaios e aves demonstraram resulta-dos satisfatórios com a tuberculina assim preparada.

SOTTMEIER e cols. (1969) desenvolveram a tuberculina "de peptídeos protoplasmáticos purificados", "P.P.P.", sigla de "purified protoplasmatic peptides tuberculin", de baixo peso molecular, com especificidade e sensibilidade superior à tu-berculina "de derivados protéicos purificados". Na técnica de produção emprega-se ultracentrifugação diferencial, liofilização, congelamento, fracionamento e homogeneização celular, com controle final por microscopia eletrônica.

Os esforços foram concentrados na obtenção de maior acuidade do produto, comparando-se tuberculinas "P.P.P." e "P.P.D.", de várias espécies de Mycobacterium, em animais sensibilizados, bem como observação de linhas de precipitação em testes de agar-gel difusão, frente à antígenos homólogos.

SZENT - IVANYI & TUBOLY (1971) descrevem um tipo de tuberculina denominada "Setulin", produzida a partir de cultu-



ras de Mycobacterium bovis, amostra "AN<sub>5</sub>", após hidrólise em temperatura de ebulição e posterior fracionamento dos filtrados através de eletroforese. Frações comuns nas diferentes espécies de Mycobacterium, como já demonstradas em reações cruzadas "in vivo" e "in vitro" por testes imunoeletroforéticos, foram removidas, sendo isolada uma glicoproteína específica. Uma fração espécie-específica, similar à descrita, foi isolada da amostra "GH" de Mycobacterium avium.

A especificidade e a sensibilidade dos métodos diagnósticos, segundo THORNER & REMEIN (1961) e, no caso especial, das reações de tuberculina, estão sujeitas à uma série de percalços, principalmente pelo número de reações inespecíficas que ocorrem, classificadas como "paraalérgicas" e "pseudoalérgicas" por SCHLIESSER (1966 e sem data). As primeiras seriam provocadas por outros tipos de Mycobacterium que não do tipo mamífero ou aviário, classificados por Runhyon em 1955 como sa profíticos e atípicos, segundo NASSAL (1961) e SCHLIESSER (1967). Fatores não relacionados com micobactérias seriam a causa das reações "pseudoalérgicas", como gravidez, irritabilidade cutânea no local de injeção, entre outros.

Para NYREDY e cols. (1968) estas reações seriam melhor denominadas de "micobactério-alergia". Os autores afirmam ainda, ser a sensibilidade à tuberculina, provocada pelas diversas espécies de Mycobacterium, sempre específica, já que é o resultado de uma reação cruzada, induzida pelos componentes antigênicos comuns a estas bactérias.

Estudos imunológicos da reação alérgica à tuberculina têm sido realizados por KANAI e cols. (1960), observando a atividade alergizante de partículas intracelulares, da parede celular e líquido citoplasmático de Mycobacterium tuberculosis. As células intactas e as paredes celulares destas demonstraram induzir o maior grau de hipersensibilidade à tuberculina. Reações alérgicas sistêmicas, tardias e fatais, foram observadas pela administração de tuberculina "velha de Koch" nos animais sensibilizados com células intactas e com paredes celulares.

NORTON & ZIFF (1965) observaram ao microscópio eletrônico a localização do antígeno nas reações de tuberculinização. O antígeno foi conjugado à ferritina, sendo esta localizada rapidamente nos macrófagos antes da acumulação nos linfócitos. Foram observadas alterações degenerativas nos macrófagos. O relacionamento do antígeno pelos macrófagos e a subsequente degeneração destes não depende de sensibilização prévia.

Para WEISER e cols. (1970) a reação alérgica à tuberculina é do tipo sensibilidade tardia. As reações desencadeadas em animais, necessitam horas para se desenvolver e persistem dias depois da aplicação do antígeno de prova. O termo é utilizado em relação ao início da reação, que se retarda, comparativamente às reações de outros tipos de sensibilidade.

Atualmente, nada se sabe sobre os anticorpos hipotéticos, que se supõe sejam a causa da sensibilidade tardia. Sem dúvida é quase seguro que estes anticorpos existam sobre as células ou no interior das mesmas, pois a sensibilidade é específica e pode transferir-se, passivamente, com células vivas, mas não com o soro de animais susceptíveis.

O valor diagnóstico do emprego de tuberculina diluída, em bovinos, à 250 a 500 unidades por dose de 0,1 ml, para a clarificação de reações não específicas, foi confirmada pelos trabalhos de BEDERKE (1960 e 1962). BRUHANN (1961) em seus trabalhos recomendou o mesmo procedimento.

PAVLAS (1965) demonstrou que o emprego de tuberculinas diluídas apresenta dificuldades na diferenciação entre bovinos infectados com M. tuberculosis e M. bovis. A dose mínima capaz de produzir reações positivas em animais infectados com M. bovis situava-se entre 6 a 12 unidades de tuberculina. Nos animais infectados com M. tuberculosis a dose necessária foi de 30 a 100 unidades.

Posteriormente PAVLAS (1968) observou que melhores resultados na tuberculinização, com finalidade de diferenciação de reações inespecíficas, foram obtidos pelo emprego de tuberculinas diluídas, em animais com infecção não específica. Em bovinos infectados com M. bovis, porém, a confiabilidade da reação diagnóstica com tuberculina diluída se reduziu. Em animais infectados com M. avium a incidência de reações positivas à tuberculina de mamíferos intensificou-se com o aumento da concentração desta tuberculina. Reações maiores que 3 mm ocorreram em 0,7% de bovinos inoculados com o produto diluído; 4,5% em bovinos inoculados com 5.000 unidades e 9,7% em bovinos com 40.000 unidades.

SCHLIESSER (1964) examinou o valor diagnóstico de tuberculinas diluídas na detecção das infecções inespecíficas, concluindo que, após infecção com micobactérias saprófitas e atípicas, observam-se menor número de reações inespecíficas, quando do uso de tuberculina para mamíferos, em dose de 500 unidades, ao invés das convencionais 5.000 unidades usadas na Alemanha Ocidental.

O problema da diferenciação das reações inespecíficas em tuberculose, se agrava, segundo SCHLIESSER (1969), quando a prevalência das infecções nos rebanhos baixa para resíduos da ordem de 0,1 a 0,2%, encontrando-se, como responsáveis, somente micobactérias saprófitas e atípicas ou o Mycobacterium avium. Estes aspectos preocupam os países que já estão em fase adiantada de controle ou mesmo erradicação da doença.

Alguns autores descrevem o decréscimo de confiabilidade nas reações diagnósticas de tuberculina pelo emprego simultâneo de doses concentradas e diluídas.

MEYN e cols. (1959 I e 1959 II) demonstraram que tuberculinas de mamíferos e de aves, diluídas ao centésimo, eram mais específicas que tuberculinas não diluídas, na clarificação de reações inespecíficas. Quando do teste intradérmico de tuberculinização em bovinos, na diluição de 500 unidades por 0,1 ml, 100% dos animais tuberculosos reagiram positivamente. Quando do teste simultâneo, porém, com tuberculina diluída e concentrada, 500 e 5.000 unidades respectivamente, só 11% dos animais tuberculosos foram positivos à tuberculina diluída enquanto 100% dos animais reagiram positivamente à tuberculina concentrada.

PAVLAS (1966 b) estudou a ação depressora da tuberculina concentrada de mamíferos, sobre a mesma tuberculina, diluída, inoculadas simultaneamente. Constatou que esta influência depressora depende principalmente das concentrações das tuberculinas empregadas. Enquanto injetamos tuberculinas nas concentrações de 50 e 5.000 unidades, respectivamente, observamos depressões médias do valor da reação de 0,5 a 2,0 mm. Quando injetamos concentrações de 500 e 5.000 unidades, observamos depressões médias do valor da reação de 1,7 a 2,6 mm.

Outros autores, por sua vez, não observaram influência negativa sobre a amplitude da reação de tuberculina diluída, exercida pela tuberculina concentrada, injetadas simultaneamente.

Assim, KRESS e cols. (1960) afirmaram que em rebanhos bovinos, reagentes não específicos são detectados com maior facilidade através de inoculação simultânea de tuberculina, em sua dose padrão de 5.000 unidades e de dose diluída ao centésimo, ou seja, 50 unidades.

MEYER (1961) expressou a mesma opinião, não encontrando em suas observações, problemas que contraindiquem a aplica-

ção simultânea de doses concentradas e diluídas de tuberculina, para o esclarecimento de reações inespecíficas.

PAVLAS (1966 a) conclui que as doses mais adequadas de tuberculina, para testes intradérmicos, situam-se entre 2.500 e 10.000 unidades. Com estas doses, 95,8% a 96,5% dos animais infectados deram reações positivas, 2,9 a 4,6% deram reações suspeitas e 0,5 a 0,8% deram falsas reações negativas.

CIORTEA e cols. (1965) observaram que testes simples com "P.P.D." mamífero, em doses de 1,00, 500 e 50 unidades mostraram-se mais específicos porém menos sensíveis que o teste com 10.000 unidades do produto. Ao reduzir o número de unidades por teste, não foi possível estabelecer um limite de diferenciação entre reações não específicas e específicas, demonstrando, outra vez, que a redução da concentração de tuberculina atuava baixando a sensibilidade do teste. A especificidade aumentava e a sensibilidade decrescia quando era reduzida a concentração da tuberculina. O teste simples com 10.000 unidades de tuberculina de mamíferos, por dose, apresenta alguma inespecificidade, a qual pode ser superada através do teste simultâneo de 10.000 unidades de tuberculina de mamíferos e 2.500 unidades de tuberculina aviária. Cinco mil unidades de tuberculina de mamíferos, por dose, foram também igualmente específicos em rebanhos bovinos isentos da doença ou com alto grau de infecção. Assim sendo, a dose de 5.000 unidades de tuberculina de mamíferos é recomendada para o teste simples, enquanto doses de 10.000 unidades de tuberculina de mamíferos e 2.500 unidades de tuberculina aviária para o teste simultâneo comparativo.

Segundo GHILARDI e cols. (1967) a dessensibilização de bovinos à tuberculina pode ser obtida mediante a aplicação de grandes doses de produto, por via subcutânea. Esta dose dessensibilizante pode ser de 400.000 a 800.000 unidades de tuberculina. Injeções intradérmicas subsequentes de 5.000 a 50.000 unidades de "P.P.D." não produziram reações positivas.

A Organização Mundial da Saúde (O.M.S.) através de seus laboratórios internacionais de referência, fornece padrões liofilizados, com 100.000 unidades internacionais de tubérculo-proteína por ml, correspondendo à 2,0 mg de tubérculo-proteína/ml, nas amostras para uso em mamíferos. As amostras aviárias de tuberculina padrão contém 25.000 unidades internacionais de tubérculo-proteína por ml, correspondendo à 0,5 mg de tubérculo-proteína/ml. (ANÔN., 1970) (RODRIGUEZ, 1972). Segundo estas fontes, a tuberculina para uso em mamíferos é produzi

da com amostras "PN", "DT" e "C" de Mycobacterium tuberculosis e a tuberculina para uso em aves, com amostras "D<sub>4</sub>" de Mycobacterium avium.

Na África do Sul, KLEEBERG & MUELENAERE (1969) informam da utilização da amostra "20.485" de Mycobacterium avium, para o "P.P.D." de uso aviário. Esta amostra é sul-africana, possuindo maior espectro que a "D<sub>4</sub>" na elucidação das infecções por micobactérias não de mamíferos, para uso no homem e nos animais.

MEYER (1962) avaliou, através de titulação biológica em cobaias, nove amostras de tuberculina, de distintas origens internacionais, encontrando consideráveis diferenças. Em amostras de tuberculina para uso em mamíferos, da Tchecoslováquia, encontrou 212.000 unidades por ml; em amostra inglesa 156.200 unidades por ml; em uma amostra polonesa 40.200 unidades por ml; em amostra húngara 71.700 unidades por ml; em amostra da Alemanha Ocidental encontrou 59.000 unidades por ml; em amostra dinamarquesa 46.180 unidades por ml; em amostra holandesa 78.000 unidades por ml e em amostra francesa 71.154 unidades por ml.

PAVLAS (1966 e) constatou que seis amostras estrangeiras e duas nacionais tchecas possuíam duas vezes a três vezes mais potência que a amostra padrão obtida na Alemanha Ocidental.

Características de tuberculinas animais empregadas em vários países estão representadas, resumidamente, no QUADRO I.

Alguns aspectos intimamente ligados à preservação e estabilização das tuberculinas, são a seguir revistas.

GEISSLER (1959) constatou que o simples congelamento de amostra "P.P.D." baixa consideravelmente a potência. Quando submetida a congelamento e descongelamento por seis vezes, a potência reduzia-se por volta de 50%. Por outro lado, não era afetada pela exposição da tuberculina à 64°C, por 16 horas.

Para PATTERSON (1960) a fração lipídica da tuberculina aparentemente incrementa a tendência de adsorção à superfície do vidro das ampolas.

SCHNEIDER e cols. (1962) encontraram decréscimo de atividade de 36,1% em tuberculina "P.P.D." contendo 5.000 unidades por ml, armazenadas em temperatura ambiente, no período de um ano. Por outro lado os autores não comprovaram perda de potência alergênica em tuberculinas concentradas, estocadas em temperatura ambiente e em refrigeração, o que constataram em tuberculinas diluídas, estocadas em refrigerador.

Segundo BLEIKER & GRIEP (1965) a gelatina, embora evidenciando maior segurança e extensão nas reações alérgicas do que o "Tween 80", não se tornou um substituto adequado para este. Tuberculinas "P.P.D." para uso humano, usadas para detectar sensibilidade específica, ou tuberculinas "P.P.D." do tipo aviário, para detectar sensibilidade não específica na espécie humana, demonstraram incremento do tamanho das reações, quando do uso de gelatina com estabilizante, em pessoas com menor grau de sensibilidade do que naquelas com forte sensibilidade à reação.

Segundo LANDI e cols. (1966) o grau de perda de potência das tuberculinas está relacionado como o tempo de estocagem, a área da superfície interna total do continente, tipo e tamanho deste, bem como com a temperatura de armazenamento. A adição de 0,005% de "Tween 80", detergente não iônico, foi suficiente para prevenir a adsorção, num período de 12 meses, com armazenamento a 10 ou 12°C. Uma diferença centesimal na concentração do detergente não afetou o tamanho da reação cutânea em cobaios sensibilizados com "B.C.G."

LESSLIE (1968) demonstrou que soluções concentradas de tuberculina "velha de Koch" e "P.P.D.", quando armazenadas em depósitos adequados, à 4°C e na obscuridade, conservam sua atividade por um período de dez anos. A adsorção de material ativo pelas paredes do vidro, faz perder mais potência à tuberculina "velha" do que a "P.P.D.". O autor também conclui que não há razão para o uso, em nenhuma circunstância, da tuberculina "velha de Koch", em lugar do "P.P.D."

TOMAN e cols. (1968) descreveram o emprego da gelatina como estabilizador, embora ainda haja significativa perda de potência, porém menos acentuada. A ação da gelatina "in vivo" seria fraca ou nula, o que a indicaria ao invés do "Tween 80", que tem ação depressora, especialmente nas reações débeis. Os autores também relatam que ampolas parcialmente cheias favorecem maior adsorção das tubérculo-proteínas à superfície do vidro, sendo, nestes casos, melhor exercida a ação estabilizante da gelatina.

LANDI e cols. (1968) estudaram a atividade antimicrobiana do fenol e chinolol (sulfato de 8 - hidroxiquinolina) em tuberculinas. O fenol a 0,3% revelou maior atividade, com espectro mais amplo. Sua concentração não se alterou durante 24 meses, armazenada a 5 ou 37°C. O chinolol diminuiu de atividade em 30% nos 24 meses, à 5°C, formando depósitos cristalinos

pela reação do 8 - hidroxiquinolína com indícios de metal presentes na solução de tuberculína. O fenol não formou precipitado. Em consequência, os autores sugerem o uso do fenol como preservativo em tuberculinas.

LANDRI e cols. (1970) não observaram diferenças no problema da adsorção, em tuberculinas "P.P.D.", preparadas pelo método de precipitação com sulfato de amônio, por ácido tricloroacético ou por combinação de ambos. Os autores observaram quarenta e duas substâncias, entre elas o "Tween 80", quanto à sua eficiência em prevenir adsorção de tubérculo-proteína ao vidro, em soluções diluídas de "P.P.D." a 50 unidades por ml e "P.P.D." marcado com  $C^{14}$ . Os melhores resultados foram obtidos com agentes tensoativos não iônicos, com alguns iônicos e com certas substâncias de baixo peso molecular foi ínfimo ou nulo. O processo de marcação das proteínas com  $C^{14}$ , carbono radioativo, foi elemento valioso para estudos desta natureza, principalmente quando de armazenamento longo.

A Organização Mundial da Saúde sugere técnicas internacionais para a avaliação e padronização bioquímica das amostras de tuberculína, descritas em ANÔN. (1967).

A avaliação e padronização biológica internacional das amostras, mediante testes comparativos com preparações padrões internacionais, foi descrita por MILES (1951). Segundo este autor, os testes são realizados em cobaios sensibilizados à tuberculína, procurando-se obter preparações que produzam nos animais mais reações da mesma intensidade e tamanho que as preparações de tuberculína padrão.

CEDRO e cols. (1963) demonstraram os vários métodos de sensibilização de cobaios ao Mycobacterium, com finalidade de executar as provas biológicas. Os autores preferem o método de sensibilização com bacilos mortos, suspensos em parafina, já que o grau de reação à tuberculína não variou muito nos vários métodos observados.

Estudos semelhantes foram realizados por PAVLAS (1966d).

VALETTE e cols. (1968) descreveram a produção de tuberculinas de várias espécies patogênicas, atípicas e saprófitas de Mycobacterium e seu emprego na triagem das infecções por estas espécies, através de testes alérgicos em cobaios pré-sensibilizados. Descrevem, também os processos de padronização bioquímica e biológica.

Para STABLEFORTH & GALLOWAY (1959) os experimentos de

laboratório em tuberculina, quando executados em cobaios, fornecem informações somente sobre o controle do método de preparação e indicam se foram cometidos erros como, contaminação de amostras, entre outros. Estes testes não dariam indicações do comportamento da tuberculina aplicada em bovinos. Se detectarmos baixa potência em cobaios, a partida certamente terá também baixa potência em bovinos mas se a tuberculina tiver eficiência padrão nos cobaios, isto não significará, obrigatoriamente, que o mesmo se repetirá em provas a campo.

Experimentos em bovinos, embora apresentando bem menor acuidade que em cobaios, dão boas informações sobre a natureza qualitativa das tuberculinas nas espécies às quais se destinam. Os trabalhos de HANSEN e cols. (1964) também concluem que a potência das partidas de tuberculina deve ser observada sob as condições para as quais estas foram produzidas.

PAVLAS (1966 c, 1966 f) descreveu a avaliação da potência de tuberculinas em bovinos. Para a titulação de cada partida são necessários, no mínimo, quinze animais tuberculosos, infectados natural ou artificialmente.

Atualmente, a O.M.S., procurando uniformizar os procedimentos internacionais, recomenda a padronização biológica em cobaios sensibilizados ao Mycobacterium, como mais exequível, econômico e de fácil padronização. (ANÔN. sem data).

MAALØE & JERNE (1952) descreveram generalidades sobre a padronização de produtos biológicos.

A avaliação estatística da potência das tuberculinas testadas, em relação às amostras padrão internacional, baseada na técnica de experimentação em blocos arrançados ao acaso, foi descrita por LEECH & GRUNDY (1953).



QUADRO I - ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DO PADRÃO INTERNACIONAL E DOS TIPOS DE TUBERCULINA EMPREGADOS EM ANIMAIS, NO BRASIL E EM OUTROS PAÍSES.

PAÍS	TIPO	ORIGEM	U.I.T/ml	CONSERVAÇÃO
Padrão internacional (ANON., 1970 e RODRIGUES, 1972).	P.P.D.	mamífera	100.000	liofilizada
	P.P.D.	aviária	25.000	liofilizada
Brasil (M. AGRICULTURA, 1971; OLIVEIRA, 1971 e LANGE-NEGGER, 1971).	P.P.D.	mamífera	5.000	líquida
	sintética	mamífera	?	líquida
	velha de Koch	mamífera	?	líquida
Alemanha Ocidental (GLASSER, 1961 e ESCHLISSER, 1966)	sintética	mamífera	50.000	líquida
	sintética	aviária	2.500	líquida
Alemanha Oriental (RICHTER, 1961, 1963)	P.P.D.	mamífera	5.000	liofilizada
Austrália (DAVIDSON, 1965a,b)	sintética	mamífera	100.000	?
Canadá (DAVIDSON, 1965, a,b)	sintética	mamífera	20.500	?
França (VUILLAUME, 1960)	sintética	mamífera	100.000	?
África do Sul (KLEBERG & col., 1969)	P.P.D.	mamífera	70.000	líquida
	P.P.D.	aviária	25.000	líquida
Japão (SCHLISSER s/data)	sintética	mamífera	100.000	líquida
Nova Zelândia (SCHLISSER, s/data)	velha de Koch	mamífera	100.000	líquida
Portugal (SCHLISSER, s/data)	P.P.D.	mamífera	25.000	líquida
E.U.A. (SCHLISSER, s/data)	sintética	mamífera	100.000	líquida

### III. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente buscamos informações junto à Divisão de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura, sobre as tuberculinas de uso animal produzidas e ou utilizadas no país. OLIVEIRA (1971) forneceu-nos dados sobre duas amostras registradas naquele órgão. Posteriormente obtivemos informações sobre outras duas amostras junto às fontes, produtora e distribuidora, respectivamente.

As amostras de tuberculina padrão internacional para mamíferos e aves foram solicitadas aos centros internacionais de referência no assunto, "Central Veterinary Laboratory" em Weybridge, Inglaterra, "Staatens SerumInstitut" em Copenhague, Dinamarca e "Centro Panamericano de Zoonosis", Buenos Aires, Argentina.

As amostras de tuberculina estudadas possuíam as seguintes características:

1. quanto a sua origem:

1.1. as amostras padrão internacional para mamíferos e aves, originárias dos órgãos internacionais de referência.

1.2. uma amostra de produção oficial por órgão federal, no país.

1.3. duas amostras produzidas por organizações oficiais estaduais, no país.

1.4. uma amostra produzida por organização particular estrangeira, distribuída e empregada no país por órgão estatal.

2. quanto a sua apresentação:

2.1. as amostras padrão internacional apresentaram se liofilizadas, em ampolas, na quantidade de 10 mg por ampola.

2.2. a amostra estrangeira apresentava-se líquida, em frasco de vidro próprio para envase de tuberculina (carpu-le), em volume de 1,8 ml, sem referência ao número de doses.

2.3. uma das amostras nacionais produzida por órgão estadual, apresentava-se líquida, em frasco de vidro com fechamento de borracha, em volume de 1,0 ml, sem referências ao número de doses.

2.4. outra amostra, de produção oficial estadual no país, apresentava-se líquida, concentrada, em frasco de vidro, tipo penicilina, acompanhado de frasco do mesmo tipo contendo diluente, ambos com fechamento de borracha e cápsula de alumínio; os volumes do concentrado e do diluente eram de 2,0 ml e 18,0 ml respectivamente, para diluição final ao décimo, num total de 40 doses.

2.5. a amostra nacional de produção oficial federal apresentava-se líquida, em frasco de vidro tipo penicilina, com fechamento de borracha e cápsula de alumínio, em volume de 2,5ml, sem referências ao número de doses.

2.6. todas as amostras possuíam indicação quanto ao prazo de sua validade.

2.7. somente uma das amostras nacionais possuía instrução quanto ao armazenamento correto.

3. quanto ao tipo de tuberculina produzido e seu destino, segundo os produtores:

3.1. tuberculinas padrões, tipo "P.P.D.", para uso em mamíferos e aves.

3.2. tuberculina "livre de albumose", para uso em bovinos.

3.3. tuberculina "bruta", idem.

3.4. tuberculina "P.P.D.", idem.

3.5. tuberculina "de meio sintético", idem.

4. quanto ao tipo de Mycobacterium utilizado na produção:

4.1. o padrão internacional para mamíferos foi produzido com Mycobacterium tuberculosis, tipo humano, amostras "PN", "DT" e "C"; o padrão internacional para aves foi produzido com Mycobacterium avium, amostra "D<sub>4</sub>".

4.2. segundo informação oficial, as duas amostras registradas no órgão controlador foram produzidas com Mycobacterium tuberculosis, tipo humano, amostras "PN", "DT" e "C".

4.3. a outra amostra de origem nacional também é produzida a partir deste tipo de Mycobacterium, segundo informação pessoal.

4.4. nada consta em relação à amostra de tuberculina de produção estrangeira.

5. quanto ao título bioquímico e biológico fornecido pelos produtores:

5.1. o padrão internacional para mamíferos possui 100.000 unidades internacionais de tuberculina por ml e 2,0 mg de tubérculo-proteína por ml; o padrão internacional para aves possui 25.000 unidades internacionais de tuberculina por ml, em 0,5 mg de tubérculo-proteína, por este mesmo ml.

5.2. uma das amostras nacionais possui valor declarado de 5.000 unidades internacionais de tuberculina por ml na da constando quanto ao seu título bioquímico.

5.3. a amostra estrangeira possui valor declarado de 50.000 unidades internacionais de tuberculina por ml, nada constando quanto ao seu título bioquímico.

5.4. as outras amostras nacionais não possuem referência quanto ao seu título bioquímico e biológico.

6. quanto a presença de preservativos:

6.1. uma das amostras nacionais continha declaração do acréscimo de fenol na concentração de 0,5%.

6.2. as amostras restantes nada continham sobre este procedimento.

7. quanto a presença de estabilizadores:

7.1. nenhuma amostra possuía declaração do emprego de estabilizantes como o "Tween 80", gelatina e outros.

7.2. não foram realizados testes específicos para pesquisa dos mesmos.

Algumas qualidades das amostras de tuberculina encontradas foram avaliadas através de métodos microbiológicos, métodos de titulação bioquímica e biológica bem como inoculações experimentais, descritos como segue:

## 1. Métodos Microbiológicos:

### 1.1. De Microscopia:

1.1.1. direta, de preparações a fresco, das diversas amostras de tuberculina, segundo técnicas descritas por ROLLE & MAYR (1966), num total de quatro montagens (uma por amostra).

1.1.2. de preparações segundo o método de GRAM, descrito por BIER (1970), num total de doze montagens (três por amostra).

1.1.3. de preparação segundo o método de ZIEHL-NEEELSEN, descrito por WINKLE (1955), num total de doze montagens (três por amostra).

1.1.4. de preparações segundo o método de STAMP, descrito por ROLLE & MAYR (1966), num total de doze montagens (três por amostra).

### 1.2. Culturais:

1.2.1. para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (B.A.A.R.) em meio de PETRAGNANI, descrito por WINKLE (1955) por semeadura direta, num total de quatro tubos (um por amostra) e após enriquecimento e tratamento por ácido acético a 1%, num total de oito tubos (dois por amostra).

#### 1.2.2. para pesquisa de enterobactérias:

1.2.2.1. em meio de GASSNER, descrito por WINKLE (1955) e ROLLE & MAYR (1966), num total de quatro placas (uma por amostra).

1.2.2.2. em meio de MAC CONKEY, descrito por DIFCO (1968), num total de quatro placas (uma por amostra).

1.2.3. para pesquisa de outros germes aeróbios, segundo métodos descritos por ROLLE & MAYR (1966):

1.2.3.1. em meio de enriquecimento, num total de quatro tubos (um por amostra).

1.2.3.2. por semeadura direta em agar sangue:

1.2.3.2.1. para estudos quantitativos, num total de quatro placas (uma por amostra).

1.2.3.2.2. para estudos qualitativos, num total de quatro placas (uma por amostra).

1.2.4. para pesquisa de germes microaerófilos e anaeróbios:

1.2.4.1. em meio de TAROZZI, segundo BIER (1970), num total de doze tubos (três por amostra).

1.2.4.2. em meio agar sangue com incubação a 37°C, sob tensão parcial de CO<sub>2</sub>, pelo método de ZEISSLER, modificado, segundo ROLLE & MAYR (1966), num total de quatro placas (uma por amostra).

1.2.5. para pesquisa micológica, em meio de SABOURAUD, descrito por MEHNERT (1966):

1.2.5.1. visando estudos quantitativos, num total de quatro placas (uma por amostra).

1.2.5.2. visando estudos qualitativos, num total de quatro placas (uma por amostra).

## 2. Inoculações experimentais:

2.1. para pesquisa de Mycobacterium vivo, segundo o método descrito pela W.H.O. (1968):

2.1.1. por inoculação em dois cobaios por amostra de tuberculina, com cerca de 350 a 450 gramas de peso, clinicamente sadios, num total de oito animais.

2.1.2. pela via subcutânea, na dose de 0,5 a 1,0 ml de tuberculina, na "plica praegenualis".

2.1.3. com observação durante seis semanas a fim de serem detectados sinais clínicos de doença ou mesmo a morte.

2.1.4. no caso de morte ou mesmo sobrevivência, os animais devem ser submetidos à necrópsia e inspeção ao final do teste.

2.2. para pesquisa de toxicidade não específica das amostras de tuberculina, segundo método descrito por LESSLIE (1961):

2.2.1. por inoculação em dois cobaios por amostra de tuberculina, com cerca de 350 a 450 gramas de peso, clinicamente sadios, num total de oito animais.

2.2.2. pela via subcutânea, na dose de 0,5 a 1,0 ml de tuberculina, na "plica praegenualis".

2.2.3. com observação durante quatro dias a fim de se detectarem sinais de intoxicação ou morte.

2.3.4. as amostras são consideradas aprovadas quando não se observam problemas no período previsto.

### 3. Método de titulação bioquímica:

3.1. para a determinação quantitativa das mg de tubérculo-proteína presentes por ml de tuberculina, segundo ANÔN. (1967):

3.1.1. pelo emprego do método do biureto modificado.

3.1.2. utilizando como solução padrão a tuberculina "standard" internacional e também o soro padrão para de terminação de densidade ótica por fotocolorimetria.

3.1.3. fazendo-se a leitura por espectrofotometria, determinando-se a densidade ótica das amostras estudadas e da amostra padrão.

3.1.4. calculando-se a concentração final de tubérculo-proteína por ml das amostras estudadas em relação ao valor da amostra padrão.

### 4. Método de titulação biológica:

4.1. para determinação quantitativa, em cobaios, das unidades internacionais de tubérculo-proteína (U.I.T.) presentes por ml de tuberculina, segundo método descrito por SCHLISSER (1966), W.H.O. (1968) e ANÔN. (sem data):

4.1.1. pela sensibilização dos animais, clinicamente sadios, com cerca de 350 a 450 gramas de peso, albinos, com uma suspensão de Mycobacterium vivo, amostras de mamíferos "PN" e "DT", na dose de 0,5 ml de uma suspensão, administrada por via subcutânea, na "plica praegenualis", com período de in cubação de seis semanas, quando se observa tuberculose generalizada e infartamento do gânglio inguinal. Utilizaram-se trinta cobaios no teste biológico.

4.1.2. pelo preparo dos animais para o teste propriamente dito, através de depilação mecânica máxima de seus flancos esquerdo e direito (uso de máquina elétrica com pente "1", "0" e "00") e a identificação dos mesmos através de fita adesiva no pavilhão auricular e de número à tinta dermográfica, na parte posterior do flanco depilado.

4.1.3. pela montagem das diluições das diversas amostras de tuberculina e da amostra padrão internacional para mamíferos, mediante emprego de solução fisiológica de clo reto de sódio, tamponada por fosfatos em pH 7,3 conforme demon



trado nas TABELAS I e II, visando obtenção de diluições finais de 50, 25, 10, cinco, 2,5 e uma unidade internacional de tuberculina por dose de 0,1 ml respectivamente. Obtiveram-se assim trinta diluições, identificadas da seguinte maneira, conforme sua origem:

- amostra I = diluições número um a seis
  - amostra II = diluições número sete a doze
  - amostra III = diluições número 1ª a 6ª
  - amostra IV = diluições número 7ª e 12ª
  - amostra padrão internacional = diluições número 1ª a 6ª, tomadas duas vezes, formando o terceiro grupo de seis cobaios.
- } formando o primeiro grupo de doze cobaios.
- } formando o segundo grupo de doze cobaios.

4.1.4. pela determinação de doze locais de inoculação nos cobaios, denominados de A a L respectivamente, demonstrados na FIGURA I.

4.1.5. pela distribuição ao acaso, com restrições, das diversas diluições de tuberculina por local nos cobaios, evitando repetições de diluição por local, como demonstram as TABELAS III, IV e V, correspondentes aos grupos descritos no item 4.1.3.

4.1.6. pela montagem das TABELAS VI, VIII e X, de inoculação e leitura, nelas constando:

4.1.6.1. o tipo de Mycobacterium utilizado na infecção dos cobaios.

4.1.6.2. a data da sensibilização.

4.1.6.3. a data da realização do teste biológico, pela tuberculinização.

4.1.6.4. as amostras de tuberculina testadas e a identificação de suas diluições.

4.1.6.5. a tuberculina padrão utilizada e seus títulos biológicos e bioquímico.

4.1.6.6. distribuição das diversas diluições, pelos diversos locais, nos diversos cobaios, conforme orientação fornecida pelo item 4.1.5.

4.1.6.7. local do registro em mm, do diâmetro das reações alérgicas cutâneas, provocadas pelas diversas diluições nos diversos locais, em leituras intervaladas de vinte e quatro horas.

4.1.7. pela montagem das TABELAS VII, IX e XI, de interpretação, nelas constando:

4.1.7.1. as amostras de tuberculina testadas e a identificação de suas diluições.

4.1.7.2. os diversos valores das TABELAS VI, VIII e X, rearranjados para a fácil interpretação dos dados obtidos.

4.1.8. pela inoculação, com auxílio de seringas especiais para tuberculina, milimetradas, de uso individual por diluição, da dose de 0,1 ml por cada diluição e por local, conforme orientação das TABELAS VI, VIII e . .

4.1.9. por leituras, intervaladas de vinte e quatro horas, feitas com auxílio de régua milimetrada transparente, do diâmetro das reações alérgicas cutâneas, registrando se os valores nas TABELAS VI, VIII e X, com posterior reorganização nas TABELAS VII, IX e XI. Valores menores que seis mm não são computados.

4.1.10. pela avaliação estatística, por estimativa gráfica, da potência biológica das diversas amostras de tuberculina em relação a amostra padrão internacional, tendo-se na ordenada os valores em mm do diâmetro das reações alérgicas cutâneas e na abcissa o logaritmo da dose de tuberculina injetada (potência relativa da dose de 0,1 ml à potência padrão inicial, de  $10^5$ ), conforme demonstra o GRÁFICO I.

Para se obter estimativa gráfica da potência da tuberculina a testar em relação à tuberculina padrão, são determinadas duas linhas paralelas que unem da melhor maneira possível os pontos referentes à relação valor em mm por logaritmo da dose. A distância horizontal que liga as duas linhas representa a diferença de potência logarítmica.

Para ser válido o teste, as curvas determinadas por interação do logaritmo da dose/valor em mm da reação, não devem fugir ao paralelismo. Neste caso não serão constantes as estimativas calculadas nos diferentes logaritmos das doses.

As estimativas mais acertadas são calculadas quando o total de reações das duas preparações de tuberculina, a testar e tuberculina padrão, são praticamente iguais e, a um limite de confiança de 95%, teremos aproximadamente 80 a 125% da potência biológica real da amostra que estamos testando.

Seguem-se as TABELAS I e II, relativas a montagem das diluições das diversas amostras de tuberculina, a FIGURA I demonstrando os locais de inoculação nos cobaios e as TABELAS III, IV e V demonstrando a distribuição das diversas diluições das tuberculinas dos vários grupos, nos locais de inoculação por cada cobaio.

TABELA I - MONTAGEM DAS DILUIÇÕES DA TUBERCULINA PADRÃO.

SOLUÇÃO ANTERIOR		QUANTIDADE DE DILUENTE (ml)	SOLUÇÃO POSTERIOR			
IDENTIFICAÇÃO	QUANTIDADE (ml)		IDENTIFICAÇÃO (DILUIÇÃO)	POTÊNCIA ABSOLUTA /ml (UIT)	POTÊNCIA REL. DA DOSE (0,1 ml) À POTÊNCIA PADRÃO INICIAL (10 <sup>5</sup> )	DISPONÍVEL (ml)
1ª	0,2	1,8	inicial	10 <sup>4</sup>	-	1,6
2ª	0,4	7,6	1"	500	0,100/200 ml	5,0
3ª	3,0	3,0	2"	250	0,050/200 ml	4,0
4ª	2,0	3,0	3"	100	0,020/200 ml	3,5
5ª	1,5	1,5	4"	50	0,010/200 ml	1,5
6ª	1,5	1,5	5"	25	0,005/200 ml	2,0
7ª	1,0	1,5	6"	10	0,002/200 ml	2,5

TABELA II - MONTAGEM DAS DILUIÇÕES DAS AMOSTRAS DE TUBERCULINA ESTUDADAS.

SOLUÇÃO ANTERIOR		QUANTIDADE DE DILUENTE (ml)	SOLUÇÃO POSTERIOR			
IDENTIFICAÇÃO	QUANTIDADE (ml)		IDENTIFICAÇÃO (DILUIÇÃO)	POTÊNCIA ABSOLUTA /ml (UIT)	POTÊNCIA REL. DA DOSE (0,1 ml) À POTÊNCIA PADRÃO INICIAL (10 <sup>5</sup> )	DISPONÍVEL (ml)
1ª	0,2	1,8	inicial	5.000	0,100/200 ml	1,4
2ª	0,6	5,4	1-7-1ª7'	500	0,050/200 ml	3,0
3ª	3,0	3,0	2-8-2ª8'	250	0,050/200 ml	4,0
4ª	2,0	3,0	3-9-3ª9'	100	0,020/200 ml	3,5
5ª	1,5	1,5	4-10-4ª10'	50	0,010/200 ml	1,5
6ª	1,5	1,5	5-11-5ª11'	25	0,005/200 ml	2,0
7ª	1,0	1,5	6-12-6ª12'	10	0,002/200 ml	2,5

TABELA III - DISTRIBUIÇÃO AO ACASO, COM RESTRIÇÕES, DAS DILUIÇÕES I A 6, DA AMOSTRA DE TUBERCULINA I, E 7 A 12, DA AMOSTRA DE TUBERCULINA II, NO PRIMEIRO GRUPO DE 12 COBAIOS, PELOS DIVERSOS LOCAIS, EVITANDO REPETIÇÕES.

COBAIO Nº	LOCAIS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	I	2	12	7	3	4	10	11	5	8	1	6	9
3	L	3	11	1	2	6	12	9	4	7	8	10	5
4	U	4	6	9	1	12	5	3	7	10	2	8	11
5	I	5	4	6	7	10	11	1	12	3	9	2	8
6	C	6	8	11	5	7	3	4	2	1	12	9	10
7	O	7	9	4	6	11	8	10	1	12	3	5	2
8	E	8	5	12	10	3	1	2	9	11	4	7	6
9	S	9	10	2	12	8	7	6	11	4	5	1	3
10		10	3	5	11	1	9	8	6	2	7	12	4
11		11	7	10	8	9	2	12	3	5	6	4	1
12		12	1	8	9	2	4	5	10	6	11	3	7

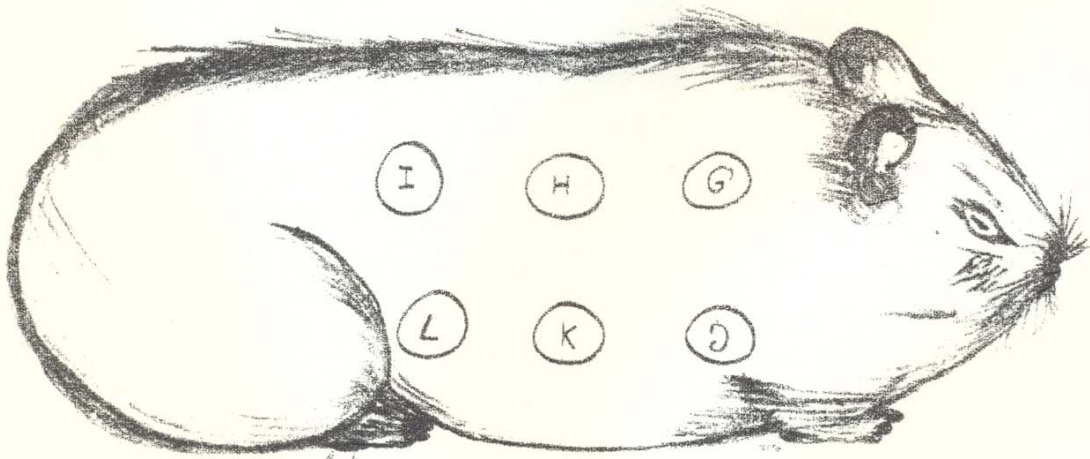
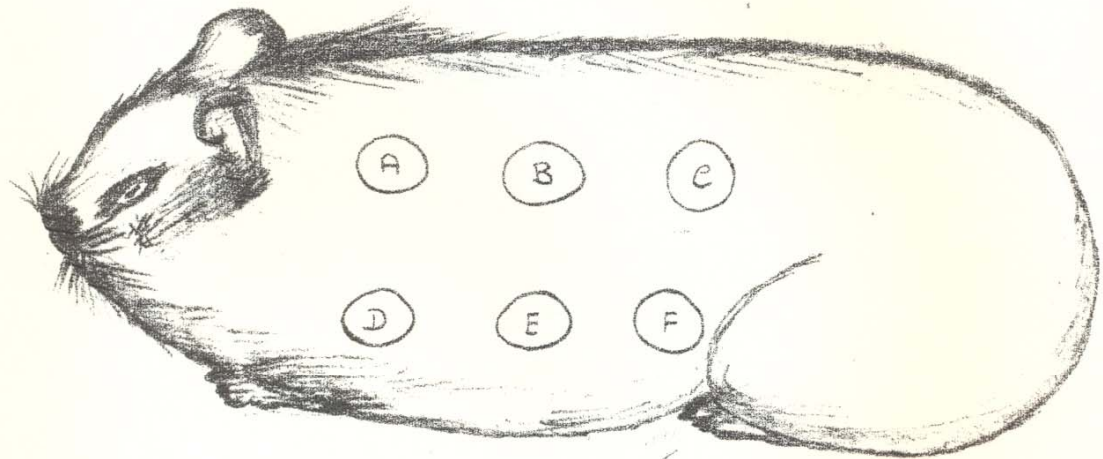
TABELA IV - DISTRIBUIÇÃO AO ACASO, COM RESTRIÇÕES, DAS DILUIÇÕES 1ª A 6ª, DA AMOSTRA DE TUBERCULINA III, E 7ª A 12ª, DA AMOSTRA DE TUBERCULINA IV, NO SEGUNDO GRUPO DE 12 COBAIOS, PELOS DIVERSOS LOCAIS, EVITANDO REPETIÇÕES.

COBAIO Nº	LOCAIS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1ª	D	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
2ª	I	2ª	12ª	7ª	3ª	4ª	10ª	11ª	5ª	8ª	1ª	6ª	9ª
3ª	L	3ª	11ª	1ª	2ª	6ª	12ª	9ª	4ª	7ª	8ª	10ª	5ª
4ª	U	4ª	6ª	9ª	1ª	12ª	5ª	3ª	7ª	10ª	2ª	8ª	11ª
5ª	I	5ª	4ª	6ª	7ª	10ª	11ª	1ª	12ª	3ª	9ª	2ª	8ª
6ª	C	6ª	8ª	11ª	5ª	7ª	3ª	4ª	2ª	1ª	12ª	9ª	10ª
7ª	O	7ª	9ª	4ª	6ª	11ª	8ª	10ª	1ª	12ª	3ª	5ª	2ª
8ª	E	8ª	5ª	12ª	10ª	3ª	1ª	2ª	9ª	11ª	4ª	7ª	6ª
9ª	S	9ª	10ª	2ª	12ª	8ª	7ª	6ª	11ª	4ª	5ª	1ª	3ª
10ª		10ª	3ª	5ª	11ª	1ª	9ª	8ª	6ª	2ª	7ª	12ª	4ª
11ª		11ª	7ª	10ª	8ª	9ª	2ª	12ª	3ª	5ª	6ª	4ª	1ª
12ª		12ª	1ª	8ª	9ª	2ª	4ª	5ª	10ª	6ª	11ª	3ª	7ª

TABELA V - DISTRIBUIÇÃO AO ACASO, COM RESTRIÇÕES, DAS DILUIÇÕES 1" A 6", DA AMOSTRA DE TUBERCULINA PADRÃO INTERNACIONAL PARA MAMÍFEROS, TOMADAS DUAS VEZES, EM GRUPO DE 6 COBAIOS, PELOS DIVERSOS LOCAIS, EVITANDO REPETIÇÕES.

COBAIO Nº	LOCAIS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1"	D	1"	2"	3"	4"	5"	6"	2"	3"	4"	5"	6"	1"
2"	I	3"	4"	5"	6"	1"	2"	4"	5"	6"	1"	2"	3"
3"	L	5"	6"	1"	2"	3"	4"	6"	1"	2"	3"	4"	5"
4"	U	2"	3"	4"	5"	6"	1"	3"	4"	5"	6"	1"	2"
5"	I	4"	5"	6"	1"	2"	3"	5"	6"	1"	2"	3"	4"
6"	Ç Õ E S	6"	1"	2"	3"	4"	5"	1"	2"	3"	4"	5"	6"

FIGURA I: LOCAIS DE INOCULAÇÃO DAS DIFERENTES DILUIÇÕES DE TUBERCULINA DENOMINADOS DE A A L NOS FLANCOS ESQUERDO E DIREITO DE COBAIA



Na apresentação dos resultados procurou-se manter sigilo quanto a identidade das diversas amostras de tuberculinas estudadas e, visando evitar eventual descuido neste particular aspecto, não será apresentado quadro sinótico dos resultados. Entretanto a identificação das amostras de I a IV é mantida na mesma ordem, em todas as provas realizadas.

Os resultados observados foram os seguintes:

1. quanto à presença de excesso de preservativos: não se observaram resultados positivos nas quatro amostras estudadas.

2. quanto à pesquisa de esterilidade em relação ao Mycobacterium (esterilidade específica): não se observaram resultados positivos aos testes, em nenhuma das quatro amostras estudadas.

3. quanto a pesquisa de esterilidade frente a germes de contaminação secundária (esterilidade secundária): não se observaram resultados positivos aos testes, em nenhuma das quatro amostras estudadas.

4. quanto a pesquisa de toxicidade não específica: não se observaram resultados positivos em nenhuma das quatro amostras estudadas.

5. quanto ao título bioquímico: observaram-se os seguintes resultados nas quatro amostras de tuberculina:

5.1. amostra I:

2,00 mg de tubérculo-proteína/ml.



5.2. amostra II:  
3,33 mg de tubérculo-proteína/ml.

5.3. amostra III:  
4,20 mg de tubérculo-proteína/ml.

5.4. amostra IV:  
2,30 mg de tubérculo-proteína/ml.

5.5. o título bioquímico da amostra de tuberculina padrão foi confirmado pelo mesmo método, por comparação com o soro padrão para determinação de densidade ótica por fotocolorimetria, sendo seu título de 2,00 mg de tubérculo-proteína por ml.

6. quanto ao título biológico das amostras estudadas:

6.1. os valores referentes às medidas do diâmetro das reações alérgicas cutâneas, do primeiro grupo de doze cobaios, pela inoculação das doze diluições das amostras de tuberculina I e II, encontram-se na TABELA VI, tendo sido reorganizados na TABELA VII.

6.2. os valores referentes ao segundo grupo de cobaios, pela inoculação das diluições das amostras III e IV, encontram-se na TABELA VIII e reorganizados na TABELA IX.

6.3. os valores referentes ao terceiro grupo, no caso seis cobaios, pela inoculação das diluições da amostra padrão para mamíferos, encontram-se na TABELA X e reorganizados na TABELA XI.

6.4. a avaliação estatística por estimativa gráfica do título biológico das diversas amostras estudadas, em relação à amostra padrão, foi realizada como demonstra o GRÁFICO I.

6.5. o cálculo das unidades internacionais de tuberculina das diversas amostras em relação à amostra padrão, considerada sua potência inicial de  $10^5$  U.I.T., foi realizado através dos valores das TABELAS VII, IX e XI e pelo método descrito no item 4.1.10. da Metodologia, observando-se os seguintes resultados:

6.5.1. título da amostra I:  
 $0,010/200 \text{ ml} = 000.010,50 \text{ U.I.T.}$   
 $1 \text{ ml} = 210.000,00 \text{ U.I.T.}$

6.5.2. título da amostra II:  
 $0,050/200 \text{ ml} = 000.002,50 \text{ U.I.T.}$   
 $1 \text{ ml} = 010.000,00 \text{ U.I.T.}$

6.5.3. título da amostra III:

0,005/200 ml = 000.020,25 U.I.T.

1 ml = 810.000,00 U.I.T.

6.5.4. título da amostra IV:

0,020/200 ml = 000.002,00 U.I.T.

1 ml = 020.000,00 U.I.T.

6.6. no cálculo percentual da perda de potência das amostras, em relação à potência inicial de  $10^5$  U.I.T. da amostra de tuberculina padrão e a potência declarada nas amostras:

6.6.1. a amostra I teve prejudicado o cálculo por não ser conhecido seu título biológico inicial.

6.6.2. a amostra II, em relação ao valor declarado de 50.000 U.I.T. já perdera 90% de sua potência ou seja, 45.000 U.I.T. Esta tuberculina teve seu prazo de validade prescrito em 27/08/1970.

6.6.3. a amostra III teve prejudicado o cálculo por não conhecermos seu título biológico inicial.

6.6.4. a amostra IV, em relação ao valor declarado de 5.000 U.I.T. já perdera 80% de sua potência ou seja, 4.000 U.I.T. Esta amostra possuía validade de uso até maio de 1972.

Seguem-se as TABELAS VI, VII, VIII, IX, X e XI bem como o GRÁFICO I, referentes aos valores relacionados com o cálculo do título biológico das amostras estudadas.

TABELA VI - INOCULAÇÃO E LEITURA DO PRIMEIRO GRUPO.

Amostra I = diluições de 1 a 6. Cobaio infectados com:  
"PN", "DT".

Amostra II = diluições de 7 a 12. Cobaio infectados em:  
27/12/1971.

padrão = Weybridge/mamíferos. Tuberculinização em:  
08/02/1972.

Título do padrão: 100.000 U.I.T./2,0mg/ml.

LOCAL		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
DILUIÇÕES		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
COBAIO Nº <u>1</u>	1ª LEITURA (mm)	20	15	14	12	10	8	12	9	6	-	-	-
	2ª LEITURA (mm)	20	15	14	12	10	8	12	9	6	-	-	-
DILUIÇÕES		2	12	7	3	4	10	11	5	8	1	6	9
COBAIO Nº <u>2</u>	1ª LEITURA (mm)	15	-	13	15	13	-	-	12	7	21	6	-
	2ª LEITURA (mm)	15	-	13	15	13	-	-	12	7	21	6	-
DILUIÇÕES		3	11	1	2	6	12	9	4	7	8	10	5
COBAIO Nº <u>3</u>	1ª LEITURA (mm)	15	-	21	18	-	-	-	13	13	7	-	13
	2ª LEITURA (mm)	15	-	21	18	-	-	-	13	13	7	-	13
DILUIÇÕES		4	6	9	1	12	5	3	7	10	2	8	11
COBAIO Nº <u>4</u>	1ª LEITURA (mm)	13	-	-	20	-	9	12	10	-	15	6	-
	2ª LEITURA (mm)	13	-	-	20	-	9	12	10	-	15	6	-
DILUIÇÕES		5	4	6	7	10	11	1	12	3	9	2	8
COBAIO Nº <u>5</u>	1ª LEITURA (mm)	10	12	7	13	-	-	22	-	17	6	15	6
	2ª LEITURA (mm)	10	12	7	13	-	-	22	-	17	6	15	6
DILUIÇÕES		6	8	11	5	7	3	4	2	1	12	9	10
COBAIO Nº <u>6</u>	1ª LEITURA (mm)	8	9	-	10	12	14	11	18	21	-	6	-
	2ª LEITURA (mm)	8	9	-	10	12	14	11	18	21	-	6	-

TABELA VI - INOCULAÇÃO E LEITURA DO PRIMEIRO GRUPO.  
(continuação)

L O C A L		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
DILUIÇÕES		7	9	4	6	11	8	10	1	12	3	5	2
COBAIO Nº <u>7</u>	1ª LEITURA (mm)	13	7	12	8	-	10	-	21	-	14	10	15
	2ª LEITURA (mm)	13	7	12	8	-	10	-	21	-	14	10	15
DILUIÇÕES		8	5	12	10	3	1	2	9	11	4	7	6
COBAIO Nº <u>8</u>	1ª LEITURA (mm)	10	10	-	-	15	20	17	6	-	13	13	7
	2ª LEITURA (mm)	10	10	-	-	15	20	17	6	-	13	13	7
DILUIÇÕES		9	10	2	12	8	7	6	11	4	5	1	3
COBAIO Nº <u>9</u>	1ª LEITURA (mm)	6	-	16	-	8	11	7	-	13	10	21	15
	2ª LEITURA (mm)	6	-	16	-	8	11	7	-	13	10	21	15
DILUIÇÕES		10	3	5	11	1	9	8	6	2	7	12	4
COBAIO Nº <u>10</u>	1ª LEITURA (mm)	-	15	10	-	20	6	8	8	15	12	-	12
	2ª LEITURA (mm)	-	15	10	-	20	6	8	8	15	12	-	12
DILUIÇÕES		11	7	10	8	9	2	12	3	5	6	4	1
COBAIO Nº <u>11</u>	1ª LEITURA (mm)	-	12	-	9	7	15	-	15	11	9	12	22
	2ª LEITURA (mm)	-	12	-	9	7	15	-	15	11	9	12	22
DILUIÇÕES		12	1	8	9	2	4	5	10	6	11	3	7
COBAIO Nº <u>12</u>	1ª LEITURA (mm)	-	18	9	7	14	12	11	-	8	-	12	13
	2ª LEITURA (mm)	-	18	9	7	14	12	11	-	8	-	12	13

TABELA VII - INTERPRETAÇÃO DO PRIMEIRO GRUPO.

Amostras: I = diluições de 1 a 6.  
II = diluições de 7 a 12.

DILUIÇÕES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1ª LEITURA	Nº/COBAIO 1	20	15	14	12	10	8	12	9	6	-	-	-
	2	21	15	15	13	12	6	13	7	-	-	-	
	3	21	18	15	13	13	-	13	7	-	-	-	
	4	20	15	12	13	9	-	10	6	-	-	-	
	5	22	15	17	12	10	7	13	6	6	-	-	-
	6	21	18	14	11	10	8	12	9	6	-	-	-
	7	21	15	14	12	10	8	13	10	7	-	-	-
	8	20	17	15	13	10	7	13	10	6	-	-	-
	9	21	16	15	13	10	7	11	8	6	-	-	-
	10	20	15	15	12	10	8	12	8	6	-	-	-
	11	22	15	15	12	11	9	12	9	7	-	-	-
	12	18	14	12	12	11	8	13	9	7	-	-	-
MÉDIA (mm)	20,5	15,6	14,4	12,3	10,5	07,6	12,2	08,1	06,3	-	-	-	
2ª LEITURA	Nº/COBAIO 1	20	15	14	12	10	8	12	9	6	-	-	-
	2	21	15	15	13	12	6	13	7	-	-	-	
	3	21	18	15	13	13	-	13	7	-	-	-	
	4	20	15	12	13	9	-	10	6	-	-	-	
	5	22	15	17	12	10	7	13	6	6	-	-	-
	6	21	18	14	11	10	8	12	9	6	-	-	-
	7	21	15	14	12	10	8	13	10	7	-	-	-
	8	20	17	15	13	10	7	13	10	6	-	-	-
	9	21	16	15	13	10	7	11	8	6	-	-	-
	10	20	15	15	12	10	8	12	8	6	-	-	-
	11	22	15	15	12	11	9	12	9	7	-	-	-
	12	18	14	12	12	11	8	13	9	7	-	-	-
MÉDIA (mm)	20,5	15,6	14,4	12,3	10,5	07,6	12,2	08,1	06,3	-	-	-	
MÉDIA GERAL	20,5	15,6	14,4	12,3	10,5	07,6	12,2	08,1	06,3	-	-	-	

TABELA VIII - INOCULAÇÃO E LEITURA DO SEGUNDO GRUPO.

Amostras: III = diluições de 1' a 6'. Cobaios infectados com: "PN", "DT".  
 IV = diluições de 7' a 12'. Cobaios infectados em: 27/12/1971.  
 padrão = Weybridge/mamíferos. Tuberculinização em 08/02/1971.  
 Título do padrão: 100.000 U.I.T./2,0mg/ml.

LOCAL		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
DILUIÇÕES		1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'
COBAIO Nº <u>1'</u>	1ª LEITURA (mm)	20	19	17	15	14	12	13	10	8	6	-	-
	2ª LEITURA (mm)	20	19	17	15	14	12	13	10	8	6	-	-
DILUIÇÕES		2'	12'	7'	3'	4'	10'	11'	5'	8'	1'	6'	9'
COBAIO Nº <u>2'</u>	1ª LEITURA (mm)	18	-	13	16	14	7	-	12	9	22	11	7
	2ª LEITURA (mm)	18	-	13	16	14	7	-	12	9	22	11	7
DILUIÇÕES		3'	11'	1'	2'	6'	12'	9'	4'	7'	8'	10'	5'
COBAIO Nº <u>3'</u>	1ª LEITURA (mm)	16	-	21	19	11	-	7	15	15	10	-	16
	2ª LEITURA (mm)	16	-	21	19	11	-	7	15	15	10	-	16
DILUIÇÕES		4'	6'	9'	1'	12'	5'	3'	7'	10'	2'	8'	11'
COBAIO Nº <u>4'</u>	1ª LEITURA (mm)	15	10	7	20	-	14	16	14	-	18	9	-
	2ª LEITURA (mm)	15	10	7	20	-	14	16	14	-	18	9	-
DILUIÇÕES		5'	4'	6'	7'	10'	11'	1'	12'	3'	9'	2'	8'
COBAIO Nº <u>5'</u>	1ª LEITURA (mm)	15	17	10	13	6	-	22	-	16	7	19	10
	2ª LEITURA (mm)	15	17	10	13	6	-	22	-	16	7	19	10
DILUIÇÕES		6'	8'	11'	5'	7'	3'	4'	2'	1'	12'	9'	10'
COBAIO Nº <u>6'</u>	1ª LEITURA (mm)	11	10	-	13	13	17	15	18	22	-	8	6
	2ª LEITURA (mm)	11	10	-	13	13	17	15	18	22	-	8	6

TABELA VIII - INOCULAÇÃO E LEITURA DO SEGUNDO GRUPO.

(continuação)

LOCAL		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
DILUIÇÕES		7'	9'	4'	6'	11'	8'	10'	1'	12'	3'	5'	2'
COBAIO Nº <u>7'</u>	1ª LEITURA (mm)	13	8	15	12	-	10	6	20	-	17	14	19
	2ª LEITURA (mm)	13	8	15	12	-	10	6	20	-	17	14	19
DILUIÇÕES		8'	5'	12'	10'	3'	1'	2'	9'	11'	4'	7'	6'
COBAIO Nº <u>8'</u>	1ª LEITURA (mm)	11	15	-	-	16	22	19	8	-	16	15	12
	2ª LEITURA (mm)	11	15	-	-	16	22	19	8	-	16	15	12
DILUIÇÕES		9'	10'	2'	12'	8'	7'	6'	11'	4'	5'	1'	3'
COBAIO Nº <u>9'</u>	1ª LEITURA (mm)	8	6	18	-	11	15	12	-	15	13	21	16
	2ª LEITURA (mm)	8	6	18	-	11	15	12	-	15	13	21	16
DILUIÇÕES		10'	3'	5'	11'	1'	9'	8'	6'	2'	7'	12'	4'
COBAIO Nº <u>10'</u>	1ª LEITURA (mm)	-	16	14	-	20	7	9	13	18	15	-	15
	2ª LEITURA (mm)	-	16	14	-	20	7	9	13	18	15	-	15
DILUIÇÕES		11'	7'	10'	8'	9'	2'	12'	3'	5'	6'	4'	1'
COBAIO Nº <u>11'</u>	1ª LEITURA (mm)	-	16	6	12	7	19	-	15	13	11	15	22
	2ª LEITURA (mm)	-	16	6	12	7	19	-	15	13	11	15	22
DILUIÇÕES		12'	1'	8'	9'	2'	4'	5'	10'	6'	11'	3'	7'
COBAIO Nº <u>12'</u>	1ª LEITURA (mm)	-	20	11	8	19	15	14	6	14	-	17	15
	2ª LEITURA (mm)	-	20	11	8	19	15	14	6	14	-	17	15

TABELA IX - INTERPRETAÇÃO DO SEGUNDO GRUPO.

Amostras: III = diluições de 1' a 6'.

IV = diluições de 7' a 12'.

DILUIÇÕES		1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'
Nº/COBAIO  1ª LEITURA	1'	20	19	17	15	14	12	13	10	8	6	-	-
	2'	22	18	16	14	12	11	13	9	7	7	-	-
	3'	21	19	16	15	16	11	15	10	7	-	-	-
	4'	20	18	16	15	14	10	14	9	7	-	-	-
	5'	22	19	16	17	15	10	13	10	7	6	-	-
	6'	22	18	17	15	13	11	13	10	8	6	-	-
	7'	20	19	17	15	14	12	13	10	8	6	-	-
	8'	22	18	16	16	15	12	15	11	8	-	-	-
	9'	21	18	16	15	13	12	15	11	8	6	-	-
	10'	20	18	16	15	14	13	15	9	7	-	-	-
	11'	22	19	15	15	13	11	16	12	7	6	-	-
	12'	20	19	17	15	14	14	15	11	8	6	-	-
MÉDIA (mm)		21,0	18,5	16,2	15,1	13,9	11,5	14,1	10,1	07,5	06,1	-	-
Nº/COBAIO  2ª LEITURA	1'	20	19	17	15	14	12	13	10	8	6	-	-
	2'	22	18	16	14	12	11	13	9	7	7	-	-
	3'	21	19	16	15	16	11	15	10	7	-	-	-
	4'	20	18	16	15	14	10	14	9	7	-	-	-
	5'	22	19	16	17	15	10	13	10	7	6	-	-
	6'	22	18	17	15	13	11	13	10	6	6	-	-
	7'	20	19	17	15	14	12	13	10	8	6	-	-
	8'	22	18	16	16	15	12	15	11	8	-	-	-
	9'	21	18	16	15	13	12	15	11	8	6	-	-
	10'	20	18	16	15	14	13	15	9	7	-	-	-
	11'	22	19	15	15	13	11	16	12	7	6	-	-
	12'	20	19	17	15	14	14	15	11	8	6	-	-
MÉDIA (mm)		21,0	18,5	16,2	15,1	13,9	11,5	14,1	10,1	07,5	06,1	-	-
MÉDIA GERAL		21,0	18,5	16,2	15,1	13,9	11,5	14,1	10,1	07,5	06,1	-	-



TABELA X - INOCULAÇÃO E LEITURA DO TERCEIRO GRUPO.

Amostras: tuberculina padrão internacional, tomadas duas vezes.  
 Título do padrão: 100.000 U.I.T./2,0 mg/ml.

Cobaios infectados com: "PN", "DT".  
 Cobaios infectados em: 27/12/1971.  
 Tuberculinização em: 08/02/1972.

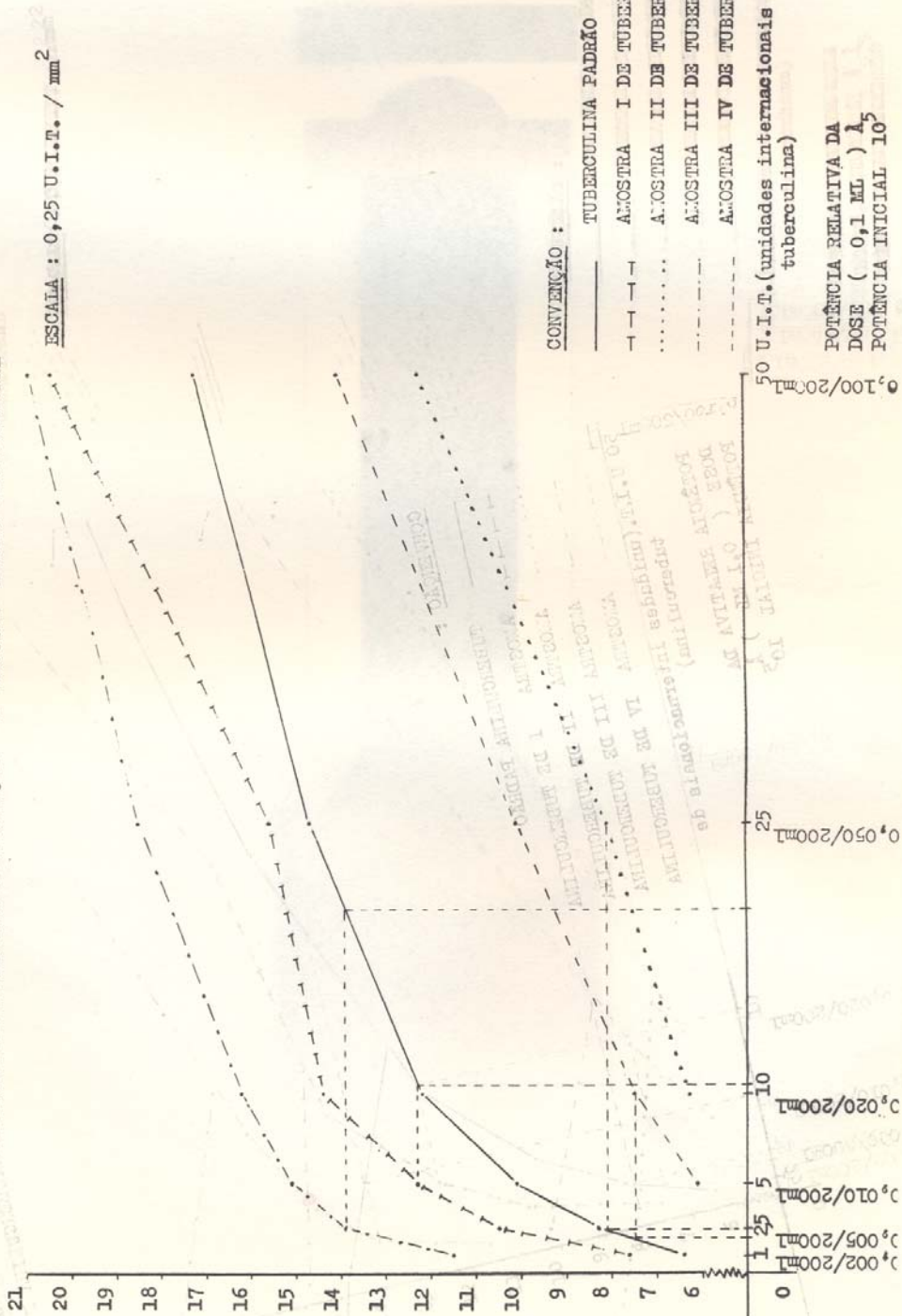
LOCAL		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
DILUIÇÕES		1"	2"	3"	4"	5"	6"	2"	3"	4"	5"	6"	1"
COBAIO Nº <u>1</u> "	1ª LEITURA (mm)	18	15	12	11	9	6	15	11	8	7	7	17
	2ª LEITURA (mm)	18	15	12	11	9	6	15	11	8	7	7	17
DILUIÇÕES		3"	4"	5"	6"	1"	2"	4"	5"	6"	1"	2"	3"
COBAIO Nº <u>2</u> "	1ª LEITURA (mm)	12	10	8	6	17	15	11	8	6	18	15	11
	2ª LEITURA (mm)	12	10	8	6	17	15	11	8	6	18	15	11
DILUIÇÕES		5"	6"	1"	2"	3"	4"	6"	1"	2"	3"	4"	5"
COBAIO Nº <u>3</u> "	1ª LEITURA (mm)	8	-	17	12	12	11	7	17	15	11	10	9
	2ª LEITURA (mm)	8	-	17	12	12	11	7	17	15	11	10	9
DILUIÇÕES		2"	3"	4"	5"	6"	1"	3"	4"	5"	6"	1"	2"
COBAIO Nº <u>4</u> "	1ª LEITURA (mm)	15	10	10	9	6	17	12	10	8	-	18	15
	2ª LEITURA (mm)	15	10	10	9	6	17	12	10	8	-	18	15
DILUIÇÕES		4"	5"	6"	1"	2"	3"	5"	6"	1"	2"	3"	4"
COBAIO Nº <u>5</u> "	1ª LEITURA (mm)	10	8	-	17	16	15	9	-	18	15	16	11
	2ª LEITURA (mm)	10	8	-	17	16	15	9	-	18	15	16	11
DILUIÇÕES		6"	1"	2"	3"	4"	5"	1"	2"	3"	4"	5"	6"
COBAIO Nº <u>6</u> "	1ª LEITURA (mm)	-	17	14	13	10	8	17	15	12	10	9	7
	2ª LEITURA (mm)	-	17	14	13	10	8	17	15	12	10	9	7

TABELA XI - INTERPRETAÇÃO DO TERCEIRO GRUPO.

Amostras de tuberculina padrão internacional  
para mamíferos, tomadas duas vezes.

DILUIÇÕES		1"	2"	3"	4"	5"	6"	
Nº/COBAIO/ LADO	1"E	18	15	12	11	9	6	
	D	17	15	11	8	7	7	
	2"E	17	15	12	10	8	6	
	D	18	15	11	11	8	6	
	1ª LEITURA	3"E	17	12	12	11	8	-
		D	17	15	11	10	9	7
		4"E	17	15	10	10	9	6
		D	18	15	12	10	8	-
		5"E	17	16	16	10	8	-
		D	18	15	16	11	9	-
	6"E	17	14	13	10	8	-	
	D	17	15	12	10	9	7	
MÉDIA (mm)		17,3	14,7	12,2	10,1	08,3	06,4	
Nº/COBAIO/ LADO	1"E	18	15	12	11	9	6	
	D	17	15	11	8	7	7	
	2"E	17	15	12	10	8	6	
	D	18	15	11	11	8	6	
	2ª LEITURA	3"E	17	12	12	11	8	-
		D	17	15	11	10	9	7
		4"E	17	15	10	10	9	6
		D	18	15	12	10	8	-
		5"E	17	16	16	10	8	-
		D	18	15	16	11	9	-
	6"E	17	14	13	10	8	-	
	D	17	15	12	10	9	7	
		17,3	14,7	12,2	10,1	08,3	06,4	
MÉDIA GERAL		17,3	14,7	12,2	10,1	08,3	06,4	

GRÁFICO I: AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA POR REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO EFEITO BIOLÓGICO DAS AMOSTRAS DE TUBERCULINA EM RELAÇÃO À AMOSTRA PADRÃO INTERNACIONAL



## V. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de técnicas de produção, visando o aprimoramento das tuberculinas, sempre mereceu especial atenção dos pesquisadores, daí resultando produtos que melhor correspondem ao aspecto da acuidade das reações diagnósticas.

Assim, as dez tuberculinas citadas na revisão de literatura, com as várias modificações introduzidas, visaram a obtenção de melhores antígenos, pois este é, sem dúvida, o ponto decisivo na acuidade das reações de tuberculinização.

Aspectos imunobioquímicos e imunohistopatológicos das tuberculinas e suas reações biológicas, mereceram estudos de KANAI e cols. (1960), NORTON & ZIFF (1965), SCHLIESSER (1966), WEISER e cols. (1970), todos tentando esclarecer a complexidade destas reações.

Tais tópicos não serão aqui discutidos, por desviarem se dos objetivos da tese e são mencionados visando motivar trabalhos subsequentes.

Em nosso país só se fabricam três tipos de tuberculina - "velha de Koch", "sintética" e "P.P.D.", todas por estabelecimentos oficiais. (OLIVEIRA, 1971; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1971; LANGENEGGER, 1971).

KIEBERG & MUELLENAERE (1969), na África do Sul, recomendam a utilização de amostras autóctones na produção de tuberculina, como é o caso de sua tuberculina aviária. A indicação de tal procedimento só se tornou exequível após estudos epidemiológicos concretos da situação da doença no meio sul-africano. Trabalhos desta natureza são de interesse em nosso país, já que as tuberculinas de uso em bovinos são produzidas com Mycobacterium tuberculosis, tipo humano, amostras de mamí-

feros, "PN", "DT" e "C", segundo a orientação internacional, as quais podem não estar correlacionadas com a etiologia da tuberculose em nosso meio.

No Brasil, com a prevalência de 4,5% no rebanho bovino segundo MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (1971), cremos ainda não haver necessidade de produção de tuberculinas homólogas à germes saprófitos. Ressente-se porém a falta de tuberculina aviária para a diferenciação das infecções inespecíficas em bovinos, mediante provas intradérmicas comparativas.

A adição de preservativos constitui, sem dúvida alguma, recurso de grande valor na conservação das tuberculinas. Entretanto o excesso é prejudicial às reações, por produzir manifestações secundárias capazes de interferir na leitura.

Pelos trabalhos de LANDI e cols. (1968) o fenol é o mais indicado dos preservativos em tuberculina. Sua pesquisa, realizada por testes biológicos, não revelou efeitos tóxicos nas amostras, mesmo na única que declarara possuir 0,5% de fenol. Deste modo, todas as amostras, mesmo as omissas quanto esta informação, não demonstraram possuir excesso de preservativo.

Outro aspecto digno de análise é a apresentação das tuberculinas, pois sabe-se hoje de seu alto significado na conservação, preservação e estabilização do produto.

As amostras padrão internacional apresentavam-se liofilizadas, em ampolas de vidro, ao contrário da amostragem estudada, todas líquidas, em frascos de diversos tipos, em pequeno conteúdo para um grande continente, na maioria das vezes. PATTERSON (1960), LANDI e cols. (1966) demonstraram a importância da relação continente/contéudo na perda de potência de tuberculina, o que pode ser atribuído, parece, à formação de finíssima camada aderida às paredes do frasco. Nas relações continente/contéudo inadequadas, a camada formada se estenderia por maior área, com maior prejuízo da disponibilidade de tubérculo-proteína.

Esta variável - continente/contéudo - não foi incluída em nossas observações, pela impossibilidade momentânea de se obter tuberculinas de mesma origem, envazadas de maneiras diversas.

Uma das amostras apresentava-se concentrada, acompanhada de diluente. Esta foi a única que trazia instruções sobre sua conveniente conservação, recomendando-se refrigeração

e obscuridade. Segundo os trabalhos de GEISSLER (1959), SCHNEIDER e cols. (1962) e LESSLIE (1968) as tuberculinas concentradas, armazenadas adequadamente, não perdiam sua potência, tão rápido, que quando estocadas em condições adversas. Estas considerações são aqui apresentadas, como uma possível explicação do melhor comportamento desta amostra nos testes biológicos e bioquímicos, pois foi a que mais se aproximou do padrão internacional.

Acreditamos serem ainda sumamente importantes as indicações dos títulos, bioquímico e biológico do produto, pois encontra-se bastante diversificado o emprego da tuberculina. Isto possibilitaria o correto uso de tuberculinas diluídas no diagnóstico de infecções por micobactérias inespecíficas, atípicas ou saprófitas, como o demonstram BEDERKE (1960 e 1962), BRUHANN (1961), PAVLAS (1965 e 1968), SCHLIESSER (1964), ou em aplicação simultânea de doses concentradas e diluídas de tuberculina, com a mesma finalidade, sugerido por MEYN e cols. (1959 I e 1959 II), KRESS e cols. (1960), MEYER (1961), CIORTEA e cols. (1965), PAVLAS (1966a, 1966b).

Falta ainda às tuberculinas nacionais a adição de estabilizadores, cujas vantagens e desvantagens foram demonstradas por BLEIKER & GRIEP (1965), TOMAN e cols. (1968) e LANDI e cols. (1970).

As observações realizadas quanto à esterilidade específica e secundária - esta por invasão de germes secundários - das diversas amostras, revelaram que os produtos encontravam-se enquadrados nas normas internacionais, isto é, eram estéreis. Estas provas são importantes devido à possibilidade de disseminação da doença ou pela desnaturação das tubérculo-proteínas ou, ainda, para evidenciar toxinas não específicas. A prova de toxicidade não específica foi totalmente negativa para todas as amostras, o que realmente era o esperado, dado a total esterilidade das amostras estudadas.

Na observação dos títulos bioquímicos, encontrou-se amostra com o dobro de miligramas de tubérculo-proteína por mililitro do que o recomendado como padrão. Esta amostra era de produção recente, não havendo ocorrido, provavelmente, perda de potência por adsorção ao continente ou por falhas de conservação. Exceto a amostra de número I, as demais possuíam valores também superiores ao padrão embora sem atingir o dobro. A amostra de referência também foi observada quanto ao seu título bioquímico, comparada com soros padrões para controle do mé

todo empregado, demonstrando-se perfeitamente padronizada dentro dos valores fornecidos como oficiais, fato este que pode ser atribuído à liofilização e a correta conservação, além de sua esmerada produção.

Vários autores colaboraram com observações sobre o método biológico de avaliação de tuberculinas, como MILES (1951), CEDRO e cols. (1963), PAVLIAS (1966d), SCHLIESSER (1966), VALETTE e cols. (1968). Existem divergências sobre a espécie a ser utilizada para a realização dos testes biológicos. STABLEFORTH & GALLOWAY (1959), HANSEN e cols. (1964), entre outros, recomendam a utilização da espécie à qual se destina o produto, principalmente visando a eficiência final do teste.

Problemas como a identificação e a obtenção do número de animais exigidos, seu grau de infecção natural ou artificial, a interpretação e avaliação estatística final dos resultados, surgem como entraves do teste biológico.

PAVLIAS (1966c, 1966f) demonstrou a necessidade de, no mínimo, quinze bovinos tuberculosos para a determinação do título biológico de cada amostra de tuberculina. No presente trabalho necessitaríamos de sessenta a setenta e cinco animais, o que nos parece pouco viável na prática.

Visando uniformizar, internacionalmente, os procedimentos, mesmo com possível perda de acuidade das observações frente à espécie homóloga, a W.H.O. (1968) e ANÔN. (sem data) recomendam a execução do teste em cobaios pré-sensibilizados, o que é mais exequível, econômico e de fácil padronização.

Análise detalhada do GRÁFICO I demonstra problema de diluição referente à amostra I de tuberculina, evidenciando o não paralelismo restrito de sua curva em relação à curva da amostra padrão. Isto ocorreu nas diluições correspondentes à sua potência relativa de 0,050/200 ml e 0,100/200 ml à potência inicial de  $10^5$  unidades internacionais de tuberculina por mililitro da amostra padrão. Deste modo, para a estimativa do título biológico desta amostra, utilizamos a diluição correspondente à potência relativa de 0,010/200 ml.

As diversas amostras de tuberculina revelaram títulos bem diferenciados, não havendo correspondência com o título biológico internacionalmente recomendado. Este título é de 100.000 unidades internacionais de tuberculina por mililitro, calculados em relação à potência inicial do padrão, de  $10^5$  unidades internacionais de tuberculina por mililitro.



Uma das amostras possuía número elevado de unidades internacionais de tuberculina por mililitro. Esta era de produção recente, possivelmente bem conservada e não adsorvida. O uso indiscriminado desta amostra, inadvertidamente ou sem perfeito conhecimento de causa, poderá, excepcionalmente, contribuir para a dessensibilização de animais doentes (GHILARDI e cols., 1967).

Com as amostras que possuíam declaração de título biológico, pôde-se calcular a perda de potência. A amostra perdeu 90% da potência. A única amostra nacional de título biológico conhecido, perdera 80% de sua potência, ainda dentro do prazo de uso, enquanto que as demais amostras tiveram prejudicados o teste.

Atribuímos este problema ao não acréscimo de estabilizantes às tuberculinas, bem como a provável má conservação e distribuição, após possível eficiente padronização na fonte produtora.

Observando os trabalhos dos diferentes autores sobre as características das tuberculinas nos diversos países, elaborados por VUILLAUME (1960), RICHTER (1961 e 1963), GLASSER (1961), MEYER (1962), DAVIDSON (1965a, 1965b), SCHLIESSER (1966 e sem data), PAVLAS (1966d), KLEEBERG & MUELENAERE (1969), concluímos, facilmente, da necessidade de padronização internacional dos métodos de produção, emprego e interpretação das reações de tuberculina.

Determinados países possuem unidades oficiais de controle e referência, estreitamente relacionados com as instituições internacionais credenciadas pela W.H.O. (1968). Desta maneira facilita-se o planejamento e a execução de ações de controle ou mesmo erradicação da tuberculose, em âmbito nacional e internacional, com inestimáveis benefícios sanitários, sociais e econômicos.

## VI. CONCLUSÕES

A tuberculina, recurso técnico essencial no diagnóstico, planejamento e execução de ações de saúde, visando controlar ou mesmo erradicar a tuberculose animal, não apresenta, no país, as desejáveis condições de instrumentalização eficiente.

A amostragem por nós estudada, representando a total disponibilidade brasileira, ofereceu as conclusões que aqui são apresentadas:

1. quanto à preservativos, não se comprovou excesso;
2. foram satisfatórias a esterilidade específica e secundária;
3. não se demonstrou toxicidade não específica das amostras;
4. somente uma amostra possui título bioquímico padrão. As demais possuem valores superiores, inclusive uma de título duplicado;
5. foram observados valores inferiores e superiores ao padrão biológico recomendado, sendo que uma possuía título oito vezes maior;
6. há acentuada perda de potência nas amostras, nas quais foi possível o cálculo por conhecermos o título biológico inicial.

Na oportunidade e como simples subsídios aos programas sanitários nacionais, nos parecem útil as seguintes sugestões:

1. a introdução de modernos avanços tecnológicos na produção de tuberculina visando a obtenção de antígenos de melhor acuidade;

2. generalizar o uso de estabilizadores e preservativos para prevenir a indesejável perda de potência verificada nas amostras onde foi possível realizar cálculos comparativos;

3. melhorar a relação continente/conteúdo, o que é fácil, prático e visa também visar a rápida perda de potência;

4. ainda para prevenir esta perda, aprimorar as condições de conservação, se possível liofilizando o produto;

5. fornecer instruções sobre a potência bioquímica e biológica, para possibilitar o emprego correto e racional, principalmente em estágios finais de programas de controle, quando poderá ser explorada a potencialidade diagnóstica oferecida pela correta variação de concentração. Isto nos parece lógico pois somente 50% das amostras estudadas se acompanhavam de instruções, e estas eram incompletas;

6. incrementar o estudo preliminar básico da situação epidemiológica da tuberculose nas diversas espécies susceptíveis, em nosso meio, visando a utilização de espécies autóctones mais prevalentes na produção de tuberculinas de maior espectro diagnóstico;

7. estabelecer obrigatoriedade de uso do padrão internacional de tuberculina para que possa haver comparação internacional de resultados e conseqüente valorização dos trabalhos sanitários nacionais;

8. e, como sugestão final, parece-nos óbvio a necessidade de criar-se um laboratório nacional de referência, especialmente orientado no sentido de controlar as condições de produção e conservação das tuberculinas produzidas em nosso país, bem como divulgar adequadas técnicas de seu emprego.

A observação de algumas qualidades das tuberculinas de uso animal, produzidas e ou utilizadas no país, em número de quatro amostras, é feito através de testes microbiológicos, inoculações experimentais, titulação bioquímica e biológica das amostras encontradas.

São analisados aspectos da origem, apresentação, tipo e destino, emprego de estabilizadores e preservativos, esterilidade específica e secundária, toxicidade, títulos bioquímicos e biológicos, bem como perda de potência.

Foram constatados problemas na padronização bioquímica e biológica, bem como acentuada perda de potência de amostras.

Evidencia-se a necessidade de uniformização do produto dentro dos padrões internacionais, tornando viáveis observações epidemiológicas concretas e o eficiente controle da tuberculose no país.

"Evaluation of some qualities of  
tuberculins for animal use in Brazil"

Qualities of four tuberculin samples, for animal use, produced and/or employed in Brazil, are studied through microbiological tests, experimental inoculations, biochemical and biological titration.

They are analysed on aspects of origin, presentation, type and destination, presence of preservatives and stabilizants, specific and secondary sterility, toxicity, biochemical and biological titers and loss of potency.

Problems were observed in the biochemical and biological standardization aspects, as well as a marked loss of potency in samples.

The uniformization necessity of the product, in international standard values, is recognized for better viability of epidemiological studies and efficiency of control measures of tuberculosis, in our country.

„Untersuchungen über Qualität von Tuberjulinen  
tierischer Anwendung in Brasilien“.

Vier Tuberjulinproben, tierischer Anwendung, inn- und ausländischer Produktion, wurden mikrobiologischer, durch Tierversuch, biochemisch und biologisch auf ihre Qualität getestet.

Herkunft, Darstellung, Typ und Anwendung, Benutzung von stabilisierenden und schützenden Mitteln, spezifische und sekundäre Esterilität, Toxizität, biochemische und biologische Titer, sowie Titerverlust, wurden untersucht.

Probleme bei der biochemischen und biologischen Standardisierung, sowie Titerverlust, wurden nachgewiesen.

Eine, Einstellung der innländischen Produktion in den internationalen Richtlinien wird gezeigt, um epidemiologische Beobachtungen, sowie Tuberjuloseüberwachung im Land erfolgreich durchzuführen.

## X. BIBLIOGRAFIA



- ANÔN., 1967 - Rapid determination of PPD in tuberculins, using a modified biuret method. Notas Técnicas. Central Veterinary Laboratory, Tuberculin Section, Weybridge, England, 2pp.
- ANÔN., 1970 - The preparation of Weybridge tuberculins. Notas Técnicas. Central Veterinary Laboratory, Tuberculin Section, Weybridge, England, 4pp.
- ANÔN., sem data - Method of assay of tuberculin in guinea-pigs. Notas Técnicas. Central Veterinary Laboratory, Tuberculin Section, Weybridge, England, 4pp.
- ARKHIPOV, V.V., NECHAEVA, L.A., FILLINOV, Yu. A. & LITICHEVSKII, M.I., 1967 - Use of ionizing radiation and ultrasonic waves in the preparation of tuberculin. Trudy gosudarst. nanchno-kontrol. Inst. vet. Preparatov, 14:284-289. Em The Vet. Bull., 38(8):509, 1968. Ref. n<sup>o</sup> 3024.
- ARKHIPOV, V.V., LURE, L.S., PROKOFEV, N.S. & KRUSHCHEV, V.G., 1968 - Economics of producing tuberculin and tuberculoprotein by the ionizing radiation process. Trudy gosudarst. nanchno-kontrol. Inst. vet. Preparatov, 15:223-225. Em The Vet. Bull., 39(3):174, 1969. Ref. n<sup>o</sup> 994.
- BEDERKE, G., 1960 - Zur Frage der Abklärung unspezifischer Tuberkulinreaktionen mit verdünntem Rinder-Einheitstuberkulin. (Clarification of non-specific tuberculin reactions with diluted bovine standard tuberculin). Rindertuberk. u. Brucellose, 9:173-180. Em The Vet. Bull., 31(7):368, 1961, Ref. n<sup>o</sup>
- BEDERKE, G., 1962 - Zur Frage der abklärung unspezifischer Tu

- berkulin-Reaktionen mit verdünntem Rinder-Einheitsstuberkin und verdünntem Geflügeltuberkin. (Clarification of non-specific tuberculin reactions by using diluted mammalian and avian tuberculins). Rindertuberk. u. Brucellose, 11:1 - 9. Em The Vet. Bull., 32(8):507-508, 1962. Ref. nº 2520.
- BIER, O., 1970 - Bacteriologia e Imunologia. 14ª Ed., Melhoramentos, São Paulo, pp.97, 518, 845, 850.
- BIRKAUG, K., PANGBORN, M.C. & CUMMEROW, E.H., 1952 - Cit. em STABLEFORTH & GALLOWAY, 1959.
- BLEIKER, M.A. & GRIEP, W.A., 1965 - The stabilization of tuberculin. Bull. Wld. Hlth. Org., 33:375-383. Em The Vet. Bull., 36(6):354, 1966. Ref. nº 2127.
- BILLAUELLE, H., 1959 - STUDIES on endotuberculin. II. Some biochemical properties of endotuberculin from human and bovine strains. Z. Immunforsch., 118:8-19. Em The Vet. Bull., 30(2):59, 1960. Ref. nº 334.
- BRETERY, J., 1951 - Cit. em STABLEFORTH & GALLOWAY, 1959.
- BRÜHANN, W., 1961 - Über Untersuchungen mit verdünntem Tuberkulin. (Tests on cattle with diluted tuberculins). Rindertuberk. u. Brucellose, 10:165-179. Em The Vet. Bull., 32(4):202, 1962. Ref. nº 988.
- BUXTON, J.B. & GLOWER, R.E., 1939 - Cit. em STABLEFORTH & GALLOWAY, 1959.
- CEDRO, V.C.F., AQUERMAN, A.L. & WESSELS VAN LEYDEN, J.L., 1963 - Sensitization of guinea pigs for the control of potency of bovine tuberculin. Rev. Invest. Ganad., 17:207-216.
- CIORTEA, G., POPESCU-BARAN, M., IONICA, C., TUDORIU, C.D., EDU, E., MARCEA, E. & CAMBIR, S., 1965 - Allergic reactions, in relation to dose of tuberculins, in cattle with tuberculosis, or other mycobacterial infections. Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur, 2(2):3-20.
- DAVIDSON, R.M., 1965a - A comparison of the efficacy of Canadian and Australian tuberculins. Part I. N.Z. vet. J., 13:109-115. Em The Vet. Bull., 36(6): 354, 1966, Ref. nº 2129.
- DAVIDSON, R.M., 1965b - A comparison of the efficacy of Canadian and Australian tuberculins. Parts II & III. N.Z. vet. J., 13:154-158 & 159-162. Em The Vet. Bull., 36(7):410, 1966. Ref. nº 2516.

- DIFCO, 1968 - Bacto Mac Conkey Agar W/OCV, Code O470. Difco supplementary literature, Detroit, Michigan, p.217.
- DORSET, N., 1934 - A comparison of Koch's old tuberculin with a new synthetic medium tuberculin. J.A.V.M.A., 37:439-456. Em Biol. Ab., 9(9):2090, 1935. Ref. n° 18989.
- GALABOV, S. & JANACKOVA, D., 1960 - Versuche zur Tuberkulierung durch Ultraschalleinwirkung auf Mycobacterium tuberculosis. (Production of tuberculin by ultrasonic treatment of tubercle bacilli). C.R. Acad. bulg. Sci., 13:463-466. Em The Vet. Bull., 32(2):74, 1962. Ref. n° 327.
- GEISSLER, A., 1959 - Der Einfluss von niedrigen und hohen Temperaturen auf die Wertigkeit flüssigen Tuberkulins. (Influence of low and high temperature on potency of liquid tuberculin). Rindertuberk. u. Brucellose, 8:115-120. Em The Vet. Bull., 30(3):109, 1960. Ref. n° 621.
- GHILLARDI, G., BARNABE, R. & PAVÁ, A., 1967 - Response to large intradermal doses of PPD tuberculin in cattle desensitized with a single massive dose of the same tuberculin subcutaneously. Annali Fac. Med. Vet. Pisa, 19:112-122. Em The Vet. Bull., 38(4):209, 1968. Ref. n° 1292.
- GLÄSSER, H., 1961 - Vergleichende Prüfung verschiedener Tuberkulinverdünnungsstufen auf ihre diagnostische Brauchbarkeit beim Rind. (Diagnostic evaluation of various tuberculin dilutions in cattle). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 74:293-297. Em The Vet. Bull., 32(2):73, 1962. Ref. n° 326.
- GRYS, S., 1967 - Preparation and chemical analysis of purified TTD (tubercle thermostable derivative) antigen. Polskie Archywn. wet., 10:445-454. Em The Vet. Bull., 38(5):296, 1968. Ref. n° 1765.
- GULD, J., RHODES, J., SORKIN, E. & BOYDENS, S., 1965 - The specificity of tuberculin preparations obtained by chemical fractionation of unheated culture filtrates. Bull. Wld. Hlth. Org., 33:385-394. Em The Vet. Bull., 36(6):354, 1966. Ref. n° 2128.
- HANSEN, O.G., LINDQUIST, K. & WAALER, H., 1964 - Assessment of the potency of tuberculin in humans and guinea-pigs. Bull. Wld. Hlth. Org., 31:171-182. Em The Vet. Bull., 35(10):618, 1965. Ref. n° 3742.
- KANAI, K., YOUMANS, G.P. & YOUMANAS, A.S., 1960 - Allergenicity of intracellular particles, cell walls and cytoplasmic fluid from Mycobacterium tuberculosis. J. Bact., 80:615-621.

- KLEEBOERG, H.H. & MUELENAERE, M., 1969 - PPD production. Notas Técnicas. Veterinary Research Institute, Tuberculin Section, Onderstepoort, Sth. África, 9 pp.
- KOCH, R., 1891 - Fortsetzung der Mittheilungen über ein Heilmittel gegen Tuberculose. Dtsch. Med. Wschr., 15 Januar: 101-102.
- KRESS, F., MATHOIS, H. & STÖCKL, W., 1960 - Untersuchungen über die Reaktionenstärke von verdünnten albumosefreiem Standardtuberkulin beim Rind. (Reaction to diluted tuberculin in cattle). Wien. Tierärztl. Mschr., 47:500-509. Em The Vet. Bull., 31(5):239, 1961. Ref. nº 1330.
- LANDI, S., HELD, H.R., HAUSCHILD, A.H.W. & HILSHEIMER, R., 1966 - Adsorption of tuberculin PPD to glass and plastic surfaces. Bull. Wld. Hlth. Org. 35:593-602. Em The Vet. Bull., 37(9):630, 1967. Ref. nº 3603.
- LANDI, S., HELD, H.R., PIVNICK, H., 1968 - Studies on phenol and chinosol used as preservatives in tuberculins PPD. Bull. Wld. Hlth. Org., 39:809-820. Em Zoonosis, 11(2):113-114, 1969.
- LANDI, S., HELD, H.R., TSENG, M.G., 1970 - Evaluation of various substances to prevent adsorption of tuberculin purified protein derivative (PPD) to glass surfaces. Bull. Wld. Hlth. Org., 43:91-106. Em Zoonosis, 13(1):28, 1971.
- LANGENEGGER, J., 1971 - Comunicação pessoal. Instituto de Pesquisa e Experimentação Agro-pecuárias Centro Sul. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1p.
- LEECH, F.B. & GRUNDY, P.M., 1953 - A normogram for assays in randomized blocks. Brit. J. Pharmacol., 8:281-285.
- LESSLIE, I.W., 1961 - The preparation of Weybridge PPD tuberculins. Notas Técnicas. Central Veterinary Laboratory, Tuberculin Section, Weybridge, England, 3pp.
- LESSLIE, I.W. 1967 - I. Methods of tuberculin production. Bull. Un. int. Tuberc., 39:113-114. Em The Vet. Bull., 33(5):296, 1968. Ref. nº 1764.
- LESSLIE, I.W., 1968 - The specificity and stability of old tuberculin and tuberculin PPD. Tubercle, 49:294-303. Em Zoonosis, 11(3):188, 1969.
- MAALØE, O. & JERNE, N.K., 1952 - The standardization of immunological substances. Ann. Rev. Microbiol., 6:349-366.

- MEHNERT, B., 1966 - Pilze. (Fungos). Em ROLLE & MAYR, 1966.
- MEYER, W., 1961 - Untersuchungen über den diagnostischen Wert verdünnter Tuberculine. (The diagnostic value of diluted tuberculins). Mh. Vet. Med., 16:911-921. Em The Vet. Bull., 32 (8):508, 1962. Ref. nº 2521.
- MEYER, W., 1962 - Vergleichende Untersuchungen von Säugertuberkulinen in und ausländischer Produktion. (Estudos comparativos de tuberculinas de mamíferos, nacionais e estrangeiras). Mh. Vet. Med., 17:573-584.
- MEYN, A., SCHLIESSER, T. & BEDERKE, G., 1959 - Zur Frage der Abklärung unspezifischer Tuberculinreaktionen mit verdünntem Rinder-Einheitstuberkulin. (Diluted tuberculin for testing non-specific reactors. I.). Rindertuberk. u. Brucellose, 8: 179-185. Em The Vet. Bull., 30(8):429, 1960. Ref. nº 2448.
- MEYN, A., BEDERKE, G. & SCHLIESSER, T., 1959 - Zur Frage der Abklärung unspezifischer Tuberculinreaktionen mit verdünntem Rinder-Einheitstuberkulin. (Diluted tuberculin for testing non-specific reactors. II.). Rindertuberk. u. Brucellose, 8: 186-202. Em The Vet. Bull., 30(8):429, 1960. Ref. nº 2449.
- MILES, A.A., 1951 - The Laboratory Assay of Tuberculin. Proced. Roy. Soc. Med., 44(12):1050-1052.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, BRASIL, 1971 - Informe da Delegação Brasileira à XVI Reunião da Comissão Técnica Regional de Sanidade Animal. 35pp.
- NASSAL, J., 1961 - Experimentelle Untersuchungen über die Isolierung, Differenzierung und Variabilität der Tuberkulosebakterien. (Observações experimentais sobre o isolamento, diferenciação e variabilidade das bactérias tuberculosas). Beiheft 2 zum Zblt. f. Vet. Med., pp.15-16.
- NORTON, W. & ZIFF, M., 1965 - Electron microscopic observations on the localization of antigen in the tuberculin reaction. Immunology, 8:81-87. Em The Vet. Bull., 35(4):204, 1965. Ref. nº 1256.
- NYIREDY, I., HEJJ, L. & TUBOLY, S., 1968 - Die Rolle der saprophytischen Mycobacterien bei der Auslösung der Tuberkuloseempfindlichkeit der Rinder. (Função das micobactérias saprófitas no desencadeamento da sensibilidade à tuberculose nos bovinos). Z. Bakt, I Abt. Orig., 206:395-403. Em Zoonosis, 10 (4):45, 1968.

- OLIVEIRA, G.C., 1971 - Comunicação pessoal. Divisão de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura, Brasília, D. F., 2pp.
- PATTERSON, D.S.P., 1960 - The lipids of Weybridge PPD. Tubercle, 41:186-190. Em The Vet. Bull., 30(11):608-609, 1960. Ref. nº 3475.
- PAVLAS, M., 1965 - The use of diluted tuberculins for differentiating between allergies induced in cattle by infection with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Vet. Pr. Ust. vet. Brno., 4:93-110.
- PAVLAS, M., 1966a - Optimal concentration of tuberculin units of mammalian PPD for the diagnosis of bovine type infection in cattle. Vet. Med. Praha, 11(1):23-25.
- PAVLAS, M., 1966b - Interaction between diluted and concentrated tuberculins inoculated simultaneously into cattle. Docum. vet., 5:81-87.
- PAVLAS, M., 1966c - Influence upon tuberculin titrations in cattle exerted by various activities of test tuberculin. Docum. vet., 5:89-100.
- PAVLAS, M., 1966d - The reliability of titration of mammalian tuberculin in guinea-pigs using different concentrations of tested tuberculin. Docum. vet., 5:101-114.
- PAVLAS, M., 1966e - Activity of some Czechoslovak and foreign mammalian tuberculins when biologically titrated in cattle. Docum. vet., 5:115-122.
- PAVLAS, M., 1966f - Titration of tuberculins in cattle and their optimum concentration. Docum. vet., 5:123-131.
- PAVLAS, M., 1968 - I. Use of diluted tuberculins in simultaneous tuberculin tests. II. Diluted tuberculins to detect paraallergic reactions to bovine tuberculin in cattle. Docum. vet., 6:103-120. Em The Vet. Bull., 39(4):258, 1969. Ref. nº 1490.
- RICHTER, W., 1961 - Untersuchungen mit verdünntem Säugetertuberkulin GT "Dessau". I. Mitteilung. (Tests with diluted "Dessau" mammalian tuberculin. I.). Mh. Vet. Med., 16:478-489. Em The Vet. Bull., 32(4):202, 1962. Ref. nº 987.
- RICHTER, W., 1963 - Tests with diluted "Dessau" mammalian tuberculin. II. Mh. Vet. Med., 18:730-734. Em The Vet. Bull., 34(6):323, 1964. Ref. nº 2069.

- RODRIGUEZ, R.T., 1972 - Comunicação pessoal. Centro Panamericano de Zoonosis. Oficina Sanitaria Panamericana. Organización Mundial da Saúde. Buenos Aires, 2pp.
- ROLLE, M. & MAYR, A., 1966 - Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. (Microbiologia e Epidemiologia geral). 3ª Ed., Enke V., Stuttgart, pp. 209-210, 212, 213, 217-218, 221-222, 225.
- SCHLIESSER, T., 1964 - Untersuchungen über die diagnostische Leistungsfähigkeit verdünnter Tuberkuline an künstlich mit Mycobacterien infizierten Kälbern. (Diagnostic value of diluted tuberculins in calves infected experimentally with various mycobacteria). Zblt. Vet. 11B:487-505.
- SCHLIESSER, T., 1966 - Bakterien. (Bactérias). Em ROLLE & MAYR, 1966.
- SCHLIESSER, T., 1967 - Atypische Mykobakterien bei Tieren. (Micobactérias atípicas em animais). Ztschft. f. Tuberk. 127(1, 2):101-108.
- SCHLIESSER, T., 1969 - Atypische Mycobacterien und unspezifische Tuberkulinreaktionen. (Atypical mycobacteria and non-specific tuberculin reaction). Schw. Arch. Tierheilk., 111:328-339.
- SCHLIESSER, T., sem data - Infektionskrankheiten und ihre Erreger. Bd. 4 Mykobakterien und mykobakterielle Krankheiten. Teil VII Bovine Tuberkulose, aviäre Tuberkulose und andere Mykobakterien. (Doenças infecciosas e seus agentes. Vol. 4 Micobactérias e doenças micobacterianas. Parte VII Tuberculose bovina, aviária e outras micobacterioses). VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp.65-180.
- SEIBERT, F.B., 1934 - The isolation and properties of the purified protein derivative of tuberculin. Amer. Rev. Tuberc., 30 (6):713-720. Em Biol. Ab., 10(1):130, 1936. Ref. nº 1160.
- SCHNEIDER, W., MICKE, H. & KRUGER, J., 1962 - Keeping quality of diluted bovine standard tuberculin. Rindertuberk. u. Brucellose, 11:98-108. Em The Vet. Bull., 33(5):229, 1963. Ref. nº 1424.
- STABLEFORTH, A.W. & GALLOWAY, I.A., 1959 - Infectious Diseases of Animals. Diseases due to Bacteria. Butterwoths Scientific Publications, Londo, vol. 2, pp.671-744.
- STOTMEIER, K.D., BEAM, R.E. & KUBICA, G.P., 1969 - Purified protoplasmatic peptides of mycobacteria: in vivo and in vitro comparison of the species specificity of purified protoplas-

- matic peptides and purified protein derivatives of mycobacterial culture filtrates. *J. Bact.*, 100(1):195-200.
- SZENT - IVANYI, T. & TUBOLY, S., 1971 - Selective tuberculin preparation to differentiate so called non-specific tuberculin reactions. Anais do XIX Congresso Mundial de Medicina Veterinária e Zootecnia, Mexico, 3:1018.
- THORNER, R.M. & REMEIN, Q.R., 1961 - Principles and Procedures in Evaluation of Screening for Disease. Public Health Monograph n° 67, U.S. Government Printing Office, Washington, 24pp.
- TOMAN, K., HEJDOVÁ, E., POLANSKY, F., STERBOVÁ, E. & GULD, J., 1968 - The stabilizing effect of gelatin on dilutions of various tuberculins, Bull. Wld. Hlth. Org., 39:801-808, Em Zoonosis, 11(2):112, 1960.
- VALETTE, L., JOUBERT, L. & OVDAR, J., 1968 - Screening for all mycobacterial infections by allergic tests. Preparation and testing of purified sensitins in guinea-pigs. Bull. Acad. vet. Fr., 41(3):119-128.
- VUILLAUME, R., 1960 - Standardisation des tuberculins et des méthodes de tuberculinisation. Rec. Med. vet., 136:1157-1164.
- WEISER, R.S., MYRVIK, Q.N. & PEARSALL, N.N., 1970 - Immunologia. Editorial Interamericano, México, pp.197-201.
- W.H.O. - 1968 - Expert Committee on Biological Standardisation. Twentieth Report. Technical Report Series n° 384, Geneva, pp.13-14, 23-41.
- WINKLE, S., 1955 - Mikrobiologische und Serologische Diagnostik. (Diagnóstico Microbiológico e Sorológico). 2ª Ed., G. Fischer V., Stuttgart, pp.3, 105, 282, 285, 287-288.