

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária



ESTUDO DA ESOFAGOSTOMOSE COMO FATOR PREDISPONENTE DE REAÇÕES
ALÉRGICAS INESPECÍFICAS NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA

Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



000117878506 0000

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

02/03/29

Belo Horizonte
Minas Gerais
1985

Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota



ESTUDO DA ESOFAGOSTOMOSE COMO FATOR PREDISPONENTE DE REAÇÕES
ALÉRGICAS INESPECÍFICAS NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte
Minas Gerais
1985

MV-00006921-9



Mota, Pedro Moacyr Pinto Coelho, 1950-

M917e Estudo da esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas no diagnóstico da tuberculose bovina. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1985.

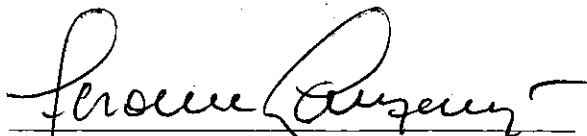
70p. ilustr.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária.

1. Tuberculose bovina - Diagnóstico. 2. Esofagostomose
I. Título.

CDD - 636.089 699 5

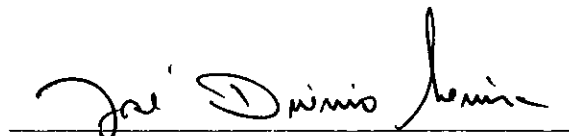
APROVADA EM: 25/06/1985



PROF. JEROME LANGENEGGER
- Orientador -



PROF. RÔMULO CERQUEIRA LEITE



PROF. JOSÉ DIVINO LIMA

A minha esposa, Elenice,
aos nossos filhos, Pedro
e Paula, e a meus pais,
que foram o grande estímulo
desta minha jornada,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jerome Langenegger, pela grande amizade e valiosa orientação.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, pela constante amizade, ensinamentos e orientação na minha carreira.

A Dra. Charlotte Hubinger Langenegger, pesquisadora da EMBRAPA, pela amizade, ensinamentos e sugestões na realização deste trabalho.

Ao Dr. Manuel Pimentel Neto, pesquisador da EMBRAPA, pela colaboração prestada durante o experimento.

A todos os funcionários da Unidade de Pesquisa em Patologia Animal da EMBRAPA Km 47 - Rio de Janeiro, com especial atenção ao Sr. Orlandino Gregório e José Enéas Barbosa pela grande ajuda na realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelos conhecimentos a nós transmitidos.

Ao Ministério da Agricultura, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

À EMBRAPA, pela cessão de suas instalações, animais e meios de cultura para realização do trabalho experimental.

À bibliotecária Eunice de Faria Lopes pela colaboração nos trabalhos de consulta e correção bibliográfica.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, pela con-

cessão da bolsa de estudos.

À FEP-MVZ - Coordenação Preventiva, FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos, pelo apoio financeiro.

Um agradecimento especial aos colegas do Curso de Mestrado Angela Cleuza, Benedito Luiz Figueiredo, Benvindo de Almeida Aguiar, Cyro de Lima Galvão, Ernesto Rodriguez Salas e Moisés Granzoti pelo convívio e amizade.

Ao Dr. Guido Antônio de Caux, pelos trabalhos de revisão.

A Sonia Maria Guimarães Araujo, pelos trabalhos da tilográficos.

A todos aqueles que de alguma maneira possibilitaram a realização deste trabalho, meus agradecimentos sinceros.

RESUMO

Com o objetivo de determinar a importância do Oesophagostomum radiatum no carregamento de micobactérias atípicas do meio ambiente para o organismo animal a ponto de sensibilizá-lo, foi realizada esta pesquisa que pode ser subdividida em duas etapas. Na primeira, trabalhou-se com materiais da mucosa entérica de bovinos de descarte, provenientes de regiões dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, comprovadamente com problemas de reações inespecíficas da prova tuberculínica. De 800 materiais trabalhados, isolaram-se 42 culturas de micobactérias, 30 (71,4%) proveniente da área do intestino, englobando um nódulo e 12 (28,6%) de área que serviu como controle, aparentemente sem lesão. Na segunda etapa desta pesquisa procurou-se comprovar o papel do Oesophagostomum radiatum como veiculador de micobactérias atípicas em bovinos. Foram criadas artificialmente larvas do Oesophagostomum radiatum em ambiente contaminado e sem contaminação de micobactérias. Nesta etapa foram utilizados três grupos de bezerros com cinco animais por grupo. Ao grupo I, administraram-se, por via oral, a cada animal 10.000 larvas de Oesophagostomum radiatum, criadas em ambiente contaminado com micobactérias. Ao grupo II, também foram administradas a cada animal 10.000 larvas criadas em ambiente sem contaminação de micobactérias. Ao grupo III, que ficou como controle, não se administraram larvas de Oesophagostomum radiatum. Esses animais foram tuberculinizados em duas ocasiões,

após 33 e 93 dias após o início do experimento. Nas condições em que foi conduzida esta pesquisa não foi notado nenhuma reação alérgica que pudesse ser atribuída à micobactérias atípicas.



SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. EVOLUÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE MICOBACTÉRIAS.....	3
2.1. Particularidades do gênero mycobacterium.....	3
2.2. Patogenicidade das micobactérias.....	4
2.3. Importância das micobactérias atípicas na medici <u>n</u> na veterinária.....	5
2.4. Importância das micobacterioses no homem.....	7
2.5. Características das micobactérias atípicas.....	9
3. LITERATURA CONSULTADA.....	13
3.1. Aspectos biológicos das micobactérias atípicas..	13
3.2. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina.....	15
3.3. Características de reações provocadas por mico- bactérias atípicas.....	17
3.4. Fatores predisponentes para sensibilizações ines- pecíficas.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Experimento 1.....	21

	Página
4.1.1. Local de trabalho.....	21
4.1.2. Material trabalhado.....	21
4.1.3. Procedência do material.....	21
4.1.4. Número de material.....	22
4.1.5. Colheita do material.....	22
4.1.6. Exame bacteriológico.....	23
4.1.7. Comportamento bioquímico.....	23
4.1.8. Comportamento sorológico.....	24
4.1.9. Preparo do antígeno.....	24
4.1.9.1. Anti-soros.....	24
4.1.9.2. Técnica.....	25
4.2. Experimento II.....	25
4.2.1. Preparo do bezerro "doador" para obtenção de cultura pura de <u>Oesophagostomum radiatum</u>	25
4.2.2. Obtenção de larvas de <u>Oesophagostomum radiatum</u> em cultura pura.....	26
4.2.3. Obtenção de larvas (L3) de <u>Oesophagostomum radiatum</u> criadas em ambiente sem contaminação de micobactérias.....	27
4.2.5. Animais utilizados na infestação experimental.....	27
5. RESULTADOS.....	29
5.1. Experimento I.....	29
5.2. Experimento II.....	31
6. DISCUSSÃO.....	39
6.1. Experimento I.....	39
6.2. Experimento II.....	41
7. CONCLUSÕES.....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
9. ANEXOS.....	52

	Página
ANEXO 1 - Meio de Löwenstein-Jensen.....	52
ANEXO 2 - Coloração de Ziehl-Neelsen.....	54
ANEXO 3 - Teste da catalase e nitrato.....	56
ANEXO 3.1 Solução de fosfatos M/15 pH 7.0.....	57
ANEXO 3.2 Teste de catalase e termo-inativação	58
ANEXO 3.3 Teste da nitrato-redutase.....	59
ANEXO 4 - Teste da arilsulfatase.....	60
ANEXO 4.1 Meio de Dubos.....	61
ANEXO 4.2 Solução a 0,08 M de disulfato de tri- potássio de fenolftaleína.....	62
ANEXO 5 - Teste da hidrólise do Tween 80.....	63
ANEXO 6 - Meio de Middlebrook.....	65
ANEXO 7 - Salina tamponada fenicada.....	66
ANEXO 8 - Cultura de larvas.....	67
ANEXO 9 - Tuberculinização dos animais do experimento...	69

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas cresceu muito o interesse pelo estudo das micobactérias, conhecidas genericamente como "atípicas", isto é, as micobactérias facultativamente patogênicas.

O contacto dessas micobactérias atípicas com o homem e os animais estabelece-se em diversas circunstâncias, possivelmente em maior frequência através da água e dos alimentos, havendo ainda a possibilidade que isso ocorra através de aerossóis (LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1976). O mecanismo pelo qual essas micobactérias penetram no organismo para sensibilizá-lo, provocando uma resposta alérgica, é pouco conhecido. HUBBERT et alii (1974) acreditam que traumas por insetos ou penetração de parasitos na pele ou na mucosa entérica podem constituir-se em porta de penetração das micobactérias ditas "atípicas". Neste sentido, HEJJ et alii (1969) puderam demonstrar experimentalmente que a alta incidência de reações alérgicas inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina está relacionada com a fasciolose de uma região. A infestação por Fasciola hepatica torna-se um fator circunstancial, pois as larvas desse parasita desenvolvem-se em locais úmidos onde também vivem micobactérias "atípicas". Nesse ambiente as micobactérias e as cercárias podem ser ingeridas com a água e o alimento. No intestino delgado, com a migração das cercárias da Fasciola hepatica através da parede intestinal, peritônio e pelo parênquima hepático, são carregadas as micobactérias que se implantam

ao longo do seu trajeto migratório, transformando-o em porta de entrada da infecção. A presença e a colonização de micobactérias "atípicas" nesse trajeto produzem a sensibilização alérgica contra essas micobactérias. Essa sensibilização, por sua vez, se manifesta como reação inespecífica na tuberculinização no diagnóstico da tuberculose.

Partindo da observação que 9,7% dos bovinos nas baías leiteiras do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais apresentaram reações inespecíficas no diagnóstico da tuberculose, com aumentos na dobra da pele no local da inoculação iguais ou superiores a 3 mm (LANGENEGGER et alii, 1981) e supondo que as larvas de Oesophagostomum radiatum pudessem, à semelhança das cercárias da Fasciola hepatica, veicular micobactérias através da mucosa e formando nódulos, principalmente na porção final do intestino delgado, para ali se desenvolverem a ponto de causarem sensibilizações alérgicas, desenvolveu-se o presente trabalho experimental para esclarecer esta hipótese.

2. EVOLUÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE MICOBACTÉRIAS

2.1. Particularidades do gênero mycobaterium

A álcool-ácido-resistência é a propriedade mais importante dos microrganismos pertencentes ao gênero Mycobacterium na sua diferenciação dos demais gêneros. No entanto, muitas características, inclusive a propriedade tintorial, se superpõem nos gêneros Mycobacterium e Nocardia, tornando difícil, em alguns casos, a diferenciação entre os mesmos. Embora a morfologia das micobactérias seja bastante semelhante, algumas propriedades, tais como a cromogenicidade e o tempo de crescimento, diferenciam em grupos distintos (ANDRADE, 1970).

Com respeito às necessidades nutricionais, usam-se meios à base de gema de ovo que são ricos em lipídios, pelos quais as micobactérias tem especial preferência. Dentre esses, o meio de Löwenstein-Jensen é universalmente usado para isolamento e posterior manutenção das micobactérias. Esse meio tem em sua composição, além de ovo como fonte de nitrogênio, glicerina como fonte de carbono, sais minerais e verde malaquita como inibidor de crescimento de germes contaminantes. A glicerina, usada na concentração de 2 a 5%, favorece o crescimento das micobactérias, exceção feita ao Mycobacterium bovis, ao qual o ferece sério obstáculo (ANDRADE, 1970).

As micobactérias pertencem à família Mycobacteriaceae, gênero Mycobacterium. São bacilos curtos aeróbicos, imóveis, não

esporulados, não capsulados, não flagelados, sendo a álcool-ácido-resistência a sua propriedade mais característica. O gênero inclui, além dos germes patogênicos, parasitas saprófitas e formas intermediárias. A maior parte das espécies que o constituem podem cultivar-se in vitro, sendo uma exceção notável o Mycobacterium leprae. O núcleo das micobactérias consiste em filamentos de ADN, sendo que a célula se acha rodeada de uma parede rígida composta por dois polietros unidos entre si, um micolato de arabinogalactano e um peptidoglicano. Sobre essa estrutura se articulam proteínas e lipoproteínas complexas. O peso seco das micobactérias está constituído por 20 a 40% de lipídios, provenientes de sua parede (CEPANZO, 1979).

2.2. Patogenicidade das micobactérias

Na medicina veterinária, o M. bovis, agente etiológico da tuberculose bovina, tem um amplo espectro de patogenicidade para várias espécies domésticas e silvestres, constituindo-se a principal causa da tuberculose animal.

A infecção pelo M. tuberculosis também evolui para a tuberculose em algumas espécies animais, destacando-se os primatas mantidos em cativeiro, o cão e o gato amigos do homem, o suíno alimentado com restos de comida e curiosamente o papagaio (MANNINGER & MÓCSY, 1973; GILLESPIE & TIMONEY). Em relação ao bovino, a infecção pelo M. tuberculosis causa apenas sensibilização alérgica passageira, que desaparece dentro de seis a oito meses quando afastada a fonte de contágio (KARLSON, 1962; RUSHFORD, 1966; ANERIK, 1974).

O M. avium, que para as aves é altamente patogênico e causa o quadro mórvido característico da tuberculose aviária, deve ser considerado como um dos microrganismos responsáveis pela micobactériose do bovino. A infecção pelo M. avium raramente causa lesões tuberculóides na espécie bovina, no entanto, produz sensibilizações alérgicas inespecíficas que interferem no diagnóstico da tuberculose bovina (KARLSON, 1962;

BOUGHTON, 1969).

O M. intracellulare, que faz parte do complexo MAIS (M. avium, M. intracellulare, M. scrofulaceum) por seu parentesco imunológico, é o agente etiológico da linfadenite tuberculóide do suíno, descrita por BAUMANN et alii (1955a, b, c, 1956), com o nome de M. suis. Essa micobactéria, que vive saprofiticamente em material orgânico, de preferência quando oriundo de fezes e urina de animais e, como tal, se encontra amplamente disseminada na natureza, pode infectar o bovino e provocar uma reação alérgica inespecífica (ROSSI, 1974; LANGENEGGER et alii, 1976; CORNER & CATHERINE, 1978b; KETTERER et alii 1981).

O M. paratuberculosis, agente etiológico da paratuberculose dos bovinos, ovinos e caprinos, provoca reações cruzadas inespecíficas no teste da tuberculinização com tuberculina bovina, dificultando o diagnóstico da tuberculose (KLEEBER, 1960; WORTHINGTON & KLEEBERG, 1965; LANGENEGGER & LANGENEGGER 1976; PORTUGAL et alii, 1979).

Da mesma forma, a dermatite nodular infecciosa (tuberculous skin lesion), causada por uma micobactéria ainda desconhecida, por não ter sido possível cultivá-la, também ocasiona falsas reações alérgicas que facilmente confundem o diagnóstico da tuberculose, provocando reações paralérgicas, ora mais acentuadas para a tuberculina bovina, ora para a aviária em testes comparativos (TRAUM, 1916, 1919; ROBERTSON & HOLE, 1937; HOLE & HULSE, 1939; YACHIDA et alii, 1973; SHIMUZU & TSUKAMURA, 1974).

Ainda outras micobactérias encontradas na natureza, além das citadas acima e que normalmente não causam quadros mórbidos no homem e nos animais, também são apontadas como prováveis responsáveis por sensibilizações alérgicas que provocam reações cruzadas com a tuberculina bovina e aviária, normalmente utilizadas no diagnóstico alérgico da tuberculose (TUFFLEY et alii, 1973; PRITCHARD et alii, 1974; CATHERINE et alii, 1977, KETTERER et alii, 1981).

2.3. Importância das micobactérias atípicas na medicina veterinária

Na medicina veterinária, além dos aspectos de saúde pública e da ação patogênica sobre o organismo animal, as micobactérias atípicas assumem interesse especial, pois infecções por várias espécies principalmente as do complexo MAIS, podem sensibilizar bovinos e mascarar ou dificultar o diagnóstico alérgico da tuberculose, desacreditando rebanhos livres.

Os seguintes pontos são de importância epidemiológica para SCHLIESSER (1970) nas micobactérias atípicas:

- a) as lesões se confundem com as da tuberculose em matadouros, podendo originar descartes desnecessários;
- b) a vigilância sanitária de rebanhos livres é dificultada porque infecções por micobactérias atípicas originam, de maneira geral, sensibilizações inespecíficas;
- c) a infecção por micobactérias atípicas não corretamente diagnosticada leva a condenação de rebanhos livres de tuberculose.

THOEN et alii (1972) revelaram que, nos Estados Unidos, em 1971, de acordo com o "Meat and Poultry Inspection Program", mais de 700.000 carcaças de suínos foram condenadas por tuberculose, sendo a maioria devido ao complexo Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum.

THOEN et alii (1976) relatam que, de acordo com a inspeção federal de carne dos Estados Unidos, a carcaça de suíno com lesão tuberculóide em dois ou mais pontos primários deverá ser cozida a 76,6°C por 30 minutos, o que diminui o valor da carcaça e limita o uso para enlatado ou outro produto processado. A carcaça que passa por cozimento perde aproximadamente 2/3 do valor original da carne.

THOEN et alii (1979) esclarecem que o Mycobacterium avium sorotipo 4, tem sido isolado de suínos originários de diferentes áreas geográficas dos Estados Unidos. Também revelam que em grandes rebanhos confinados pode-se encontrar de 5 a 30% dos suínos com lesão tuberculóide, no matadouro.

As reações paralérgicas causadas pela sensibilização do organismo por várias micobactérias e em diferentes circunstâncias, constitui problema na interpretação do diagnóstico alérgico da tuberculose, tanto na espécie humana como na animal. Nos países que tiveram alta prevalência da tuberculose bovina, esse problema se faz sentir mais intimamente na fase final da erradicação da doença. Nos países com baixa prevalência de tuberculose, o problema dos falsos positivos interfere acentuadamente (LANGENEGGER et alii, 1981).

KANTOR et alii (1981) descrevem os casos provocados por micobactérias do complexo MAIS em bovinos na Argentina como indistinguíveis macro e microscopicamente das lesões tuberculosas e só é possível diferenciar suas origens pelo estudo bacteriológico. Por esse motivo há um considerável erro por excesso de descarte em matadouros.

EVERITT et alii (1982) consideram a infecção micobacterial em suínos, nos Estados Unidos, um entrave significante em determinadas áreas, sendo o mais importante o Mycobacterium avium sorotipos 1 e 2.

2.4. Importância das micobacterioses no homem

Na medicina humana, as infecções causadas por micobactérias "atípicas" foram denominadas micobacterioses, para diferenciá-las da tuberculose causada pelo M. tuberculosis e M. bovis.

MAGALHÃES (1966) considera as micobactérias atípicas um grupo heterogêneo de bactérias álcool-ácido-resistentes, potencialmente capazes de produzir no homem pneumopatias semelhantes à tuberculose, além de sensibilizar os indivíduos infectados à tuberculina.

No passado, as micobactérias que não produziam infecções em cobaias eram sempre consideradas saprófitas. No entanto, recentemente HAAS et alii (1968) relatam que as amostras das chamadas micobactérias atípicas, que não eram patogê-

nicas para cobaias, tem sido freqüentemente descritas como causas de doenças semelhantes à tuberculose no homem.

REZNIKOV (1970) mostra que as micobactérias atípicas causam doenças pulmonares no homem, as quais são radiológica e histologicamente indistinguíveis da tuberculose.

Com relação ao homem, ANDRADE (1970) divide as micobactérias em dois tipos: as que são responsáveis pela tuberculose, M. tuberculosis e M. bovis e as micobactérias não tuberculosas ou atípicas. Dentre estas encontram-se as que são responsáveis por afecções viscerais ou ganglionares, como M. kansasii, M. intracellulare, M. fortuitum, M. xenopi, M. avium e M. scrofulaceum; as responsáveis por ulcerações cutâneas M. marinum e M. ulcerans e as praticamente não patogênicas M. aquae e M. terrae.

ANDRADE & SANTIAGO (1971) consideram as micobactérias atípicas um grupo importante na patologia humana, especialmente em pneumologia e dermatologia, sendo que as enfermidades não se diferem no seu curso e nos aspectos anátomo-patológicos da forma típica de tuberculose pulmonar ou extrapulmonar. Os sinais clínicos e radiológicos não tem qualquer especificidade e não permitem suspeitas do caráter atípico do agente causal.

Do ponto de vista terapêutico, KUBALA (1972) divide as infecções por micobactérias atípicas no grupo que provoca linfadenite em crianças, independente do tipo de infecção bacteriana, com bom prognóstico e no grupo das micobacterioses pulmonares em adultos, sempre um difícil problema terapêutico.

RUNYON (1974) admite que, excluídos o M. tuberculosis e o M. bovis, na atualidade existem dez espécies de micobactérias patogênicas para o homem, M. leprae, M. ulcerans, M. kansasii, M. marinum, M. simiae, M. szulgai, M. avium, complexo Mycobacterium scrofulaceum, M. xenopi, complexo Mycobacterium fortuitum. Outras espécies descritas na literatura não têm importância clínica. Todas essas micobactérias são potencialmente patogênicas dependendo da susceptibilidade do hospedeiro. No entanto, as quatro primeiras espécies relacionadas, se encontradas em tecidos

dos doentes, são quase que invariavelmente os agentes da doença. As outras ocorrem mais comumente como contaminantes ou comensais.

FONSECA (1976) considera como patogênicas para o homem o M. kansassi, M. marinum e M. simiae no grupo I, M. scrofulaceum e M. szulgai no grupo II, M. avium, M. intracellulare e M. xenopi no grupo III, M. fortuitum e M. chelonae no grupo IV.

FLEISCHMAN et alii (1982) relata que entre as micobactérias do grupo III, principalmente M. intracellulare, tem sido descrita como causa de doença crônica pulmonar. No entanto, a doença não aparece como sendo altamente contagiosa, não acometendo, de maneira geral, mais do que um membro da família. Nos últimos tempos essa micobacteriose tem se tornado importante em alguns países.

Ainda FLEISCHMAN et alii (1982) observaram que, nas últimas décadas, o número de isolamentos do M. intracellulare sorotipo 10 quadruplicou em pacientes humanos de Massachusetts. Também esse microrganismo tem sido isolado da água de torneira dos hospitais de Boston.

EVERITT et alii (1982) classificam como dramático o número de pacientes infectados com microrganismos do complexo aviário em certas regiões dos Estados Unidos, sendo maior na zona rural do que em áreas urbanas.

2.5. Características das micobactérias atípicas

RUNYON (1959) propôs uma divisão das micobactérias baseando-se no tempo de crescimento e na cromogenicidade. Essa classificação consta de quatro grupos e não inclui as espécies típicas e as não ou dificilmente cultiváveis, M. tuberculosis e M. bovis, M. leprae, M. lepraemurium, M. microti, M. paratuberculosis.

Grupo I - Agrupam-se as micobactérias fotocromógenas. Essas micobactérias têm um crescimento lento e apresentam colônias não pigmentadas na obscuridade. Os cultivos jovens ad

quirem cor amarelada ao serem expostos à luz.

Grupo II - micobactérias denominadas escotocromógenas têm um crescimento lento, colônias pigmentadas amarelas ou alaranjadas, mesmo na obscuridade.

Grupo III - neste grupo estão as micobactérias de crescimento lento, não cromógenas. Em alguns casos de cultivos velhos adquirem cor amarelada.

Grupo IV - aqui estão agrupadas, as micobactérias de crescimento rápido, menos de uma semana. Neste grupo podem aparecer colônias pigmentadas ou não.

RUNYON (1959) considera os grupos I e III os mais importantes patógenos, podendo ser distinguidos pela presença ou ausência de pigmentos quando expostos à luz.

MAGALHÃES (1966) considera uma amostra de micobactéria atípica como patógena para o homem, quando isolada em cultura pura, primocultura abundante, isolamento repetido e é proveniente de um indivíduo virgem de tratamento.

SELKON (1969) relata que o M. kansassi é o mais patogênico das micobactérias do grupo I e no grupo II o M. scrofulaceum é patógeno oportunista e o M. aquae não é patogênico. No grupo III, pode-se dividir as micobactérias em dois grupos, as "tween" positivas M. terrae e M. gastri, que não são patógenas e as hidrólises do "tween" negativas ou oportunistas patógenos. Ainda SELKON (1969) esclarece que com exceção de algumas amostras de M. xenopi, todas as micobactérias são resistentes à isoniazida (INH), à pirazinamida (PZA) e ao ácido para-amino salicílico (PAS).

ANDRADE (1970) esclarece que no caso do M. tuberculosis ou M. bovis, é bastante o aparecimento de uma colônia para que o diagnóstico bacteriológico esteja assegurado. O mesmo não acontece com outras micobactérias, que podem ser isoladas e não estarem relacionadas com o quadro clínico. Também ANDRADE (1970) observou que podem ser isoladas micobactérias atípicas de lesões já cicatrizadas de casos de tuberculose humana tratados e curados há alguns anos e que a presença destas bactérias pode

ser confundido com recaída da tuberculose.

SCHLIESSER (1970) acredita que de acordo com a experiência atual e do ponto de vista prático, as infecções dos animais por micobactérias atípicas não são transmissíveis de animal para animal.

FRANCIS et alii (1973) observaram nos resultados de pesquisas em dois rebanhos, onde havia reagentes não específicos e animais tuberculosos, que as reações inespecíficas foram mais comumente encontradas em bovinos novos e as específicas da tuberculose em bovinos mais velhos.

PRITCHARD et alii (1974), pesquisando hipersensibilidade retardada em bovinos de Uganda, utilizaram sensitinas produzidas a partir de amostras de M. fortuitum, M. gordonai e M. chelonae e demonstraram que o M. fortuitum e M. gordonai são capazes de induzir hipersensibilidade retardada em bovinos desde que estas micobactérias estivessem presentes no meio ambiente.

McGAVIN et alii (1977), trabalhando com bovinos, observaram que após inoculação de micobactérias do complexo M. avium-intracellulare, formavam-se granulomas caseocalcáreos, os que se tornaram encapsulados, formando geralmente lesões não progressivas. No mesmo experimento foram inoculados dois bovinos com dose similar de M. bovis, sendo observadas lesões progressivas disseminadas sem encapsulação na necropsia desses animais.

MERKAL & CRAWFORD (1979), em isolamentos de micobactérias atípicas de suínos e homem, representando os sorotipos 1, 2, 4, 8 e 10 do complexo M. avium-intracellulare, compararam a tolerância desses sorotipos ao calor em suspensão aquosa e verificaram que o mais resistente foi o sorotipo 10 isolado de homem.

THOEN et alii (1979) inocularam experimentalmente seis suínos com M. avium sorotipo 4. Após 80 dias, os animais apresentaram granulomas microscópicos nos linfonódios mesentéricos e cervical.

SONGER (1980) confirmou que a transmissão das mico



bactérias atípicas não é de pessoa a pessoa nem de animal para animal, mas sim do meio ambiente para homem ou animal.

3. LITERATURA CONSULTADA

3.1. Aspectos biológicos das micobactérias atípicas

KUBICA et alii (1963) relataram leve variação nas propriedades físicas e bioquímicas de micobactérias isoladas do solo e de animais, o que entretanto, não exclui a possibilidade de o solo ser o reservatório das micobactérias atípicas.

WOLINSKY & RYNEARSON (1968) acreditam que o solo suporta a existência e provavelmente a multiplicação de micobactérias semelhantes àquelas capazes de causar doença no homem, no entanto, as reações bioquímicas das amostras isoladas do solo são usualmente diferentes das amostras associadas com doença.

Toda a classe de micobactérias atípicas tem sido encontrada na natureza e no ambiente imediato dos animais domésticos, com exceção do M. kansassi que nunca pôde ser isolado do solo GONTIJO (1972). Também se comprovou que a água estancada e os lugares em contato permanente com a água são as fontes mais frequentes de micobactérias atípicas, além disso, esta tem grande importância na veiculação dessas micobactérias (SCHLIESSER, 1970; KAZDA, 1970 e RUNYON, 1974).

LANGENEGGER & LANGENEGGER (1974) consideram o suíno como excelente sentinela epidemiológico em regiões rurais para a tuberculose humana, bovina e aviária. Ao mesmo tempo pos-

sibilita denunciar a existência no meio em que vive de outras micobactérias facultativamente patogênicas para o homem e os animais.

Em certas circunstâncias e condições de meio, LANGENEGGER et alii (1975) acreditam que determinadas espécies ou raças de micobactérias atípicas multiplicam-se mais intensamente e se mantêm viáveis por mais tempo num determinado ambiente, podendo variar a prevalência em regiões ou locais diferentes.

O reservatório ou "habitat" das micobactérias atípicas, conforme conclusão de FONSECA (1976), são aspectos ainda discutidos. O solo, água, vegetal, animais e produtos derivados são relacionados como prováveis fontes de infecção, não havendo indícios de transmissão direta entre seres humanos. Sa-be-se muito pouco sobre a epidemiologia das doenças causadas pelas micobactérias atípicas. O reservatório e a fonte de infecção para o homem não foram ainda definidos. A distribuição geográfica e a ausência de dados quanto a transmissão por contato direto sugerem que o reservatório seja uma fonte ambiente.

Também CRISTOVÃO (1976) concluiu que o "habitat" das micobactérias atípicas ainda não está perfeitamente definido e parece variar bastante entre as diferentes espécies. Isolamentos constantes de solos, águas, vegetais, animais e derivados têm sido feitos, o que sugere uma provável fonte de infecção. Ainda CRISTOVÃO (1976) concluiu que as espécies pertencentes aos grupos II, III e IV de RUNYON têm sido isoladas de solo, poeira, animais domésticos e várias outras fontes, havendo possibilidades de os animais serem intermediários na cadeia epidemiológica, infectando o homem diretamente ou através de contaminação do solo. Entretanto, não se exclui a possibilidade de ambos, homens e animais infectarem-se a partir de uma fonte comum.

LANGENEGGER & LANGENEGGER (1976) acreditam que as micobactérias ditas atípicas, encontram-se ubiqüitariamente na natureza, variando, no entanto, de região para região a concentração das diferentes espécies.

SAITANU & HOLMGAARD (1977), em um surto epizootico de M. intracellulare sorotipo 8 em suínos, isolaram esse microrganismo de serragem da cama e da poeira coletada dos chiqueiros.

NIAZ & SIDDIQI (1979) relatam que o reservatório natural desses microrganismos permanece desconhecido até o momento, sendo as fontes ambientes e animais as causas mais prováveis da infecção.

CORNER & CATHERINE (1979), trabalhando com amostras de micobactérias atípicas isoladas de solo e inoculadas em bovinos, concluíram que os resultados deste experimento são consistentes com a hipótese de que o solo serve como reservatório de micobactérias atípicas capazes de causar sensibilização não específica em bovinos.

SONGER (1980), trabalhando com culturas de vegetais, frutas e cereais, isolou micobactérias somente das partes comestíveis que estavam em contato com o solo e concluiu que a micobactéria depende da atividade biológica do solo. O fato de haver uma leve variação bioquímica entre as micobactérias encontradas no solo e em animais, não exclui o solo como um potencial reservatório de infecção para os animais.

GEORGE et alii (1980), trabalhando com águas de mar do leste dos Estados Unidos, concluíram que essa água também pode ser fonte de contaminação e reservatório secundário para micobactérias patogênicas do complexo MAIS.

Também KETTERER et alii (1981) apontaram o solo como possível reservatório de micobactérias do complexo M. avium, capazes de infectar bovinos.

3.2. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina

O estudo das reações inespecíficas para a tuberculose bovina foi iniciado por TRAUM (1916, 1919) ao descrever a tuberculose cutânea "tuberculous skin lesions" ou dermatite no

dosa infecciosa em bovinos. Parte dos animais portadores das lesões granulomatosas tuberculóides, nas quais eram evidenciáveis germes álcool-ácido-resistentes não cultiváveis, reagia ao teste da tuberculinização, provocando reações paralérgicas, ora mais acentuadas para a tuberculina bovina ora para a aviária em testes comparativos. Observações semelhantes foram feitas por (ROBERTSON & HOLE, 1937).

KARLSON (1962) define o bovino como sendo relativamente resistente à infecção por M. tuberculosis e alguma lesão que usualmente desenvolve é limitada e regride. Reações à tuberculina em bovinos expostos ao bacilo humano tendem a declinar e eventualmente a desaparecer assim que removida a fonte de infecção.

LANGENEGGER et alii (1976), trabalhando com um rebanho de 325 bovinos de uma fazenda no estado de São Paulo, observaram que 27 (8,3%) dos animais, reagiram inespecificamente em três tuberculinizações sucessivas. Essas reações inespecíficas foram atribuídas ao M. intracellulare, supostamente veiculados pelo capim picado, proveniente de capineira adubada com fezes de suínos portadores de lesões tuberculoides.

LANGENEGGER & LANGENEGGER (1976) admitem que o M. avium e o M. paratuberculosis possam ser a causa da maioria das reações paralérgicas no diagnóstico da tuberculose bovina, em regiões onde a incidência da tuberculose aviária e de paratuberculose é alta. Por outro lado, em regiões que não ocorrem ou em que são assinaladas apenas esporadicamente as duas entidades mórbidas acima citadas, as falsas reações positivas no diagnóstico da tuberculose parecem ser provocadas principalmente por outras micobactérias atípicas, auxiliadas ou não por fatores circunstanciais. Estas causariam infecções clínicas ou subclínicas e conseqüentemente poderiam sensibilizar o organismo do bovino a ponto de interferir no diagnóstico da tuberculose.

FODSTAD (1977) acredita que a serragem usada como cama para bovinos e suínos pode servir como uma importante fonte de contágio de micobactérias atípicas e conseqüentemente so

brevir a sensibilização alérgica inespecífica no diagnóstico da tuberculose.

As causas das reações paralérgicas encontradas na região Sudeste do Brasil, para LANGENEGGER et alii (1981), não podem ser atribuídas a infecções por M. avium ou M. johnei, pois a tuberculose aviária e a paratuberculose bovina só ocorrem esporadicamente no Brasil. No entanto, foram encontrados com relativa frequência vários sorotipos do M. intracellulare e M. scrofulaceum, aos quais pode-se atribuir a maioria da sensibilização alérgica em nosso meio.

3.3. Características de reações provocadas por micobactérias atípicas

KLEEBERG (1960) divide as reações alérgicas em bovinos, de acordo com sua origem em três tipos:

- a) tipo específica, são as reações provocadas pelo M. bovis;
- b) grupo específica ou para-alérgica, incluindo todas as reações causadas por micobactérias outras que não o M. bovis, isto é, o M. avium, M. tuberculosis, M. johnei, "skin lesion" e outros organismos álcool-ácido-resistentes;
- c) tipo não específico ou heteroalérgica, condições de sensibilidade outras que não as mencionadas nas duas categorias anteriores.

RUSHFORD (1966), tuberculinizando 250 rebanhos bovinos, em vários distritos do sudeste, norte e nordeste de Vitória na Austrália, observou três pontos de significativa importância em 94 animais portadores de reações inespecíficas:

- a) cinquenta e três por cento dos reagentes inespecíficos não apresentaram mais sensibilidade alérgica, quando testados comparativamente 30 a 42 dias após o teste inicial;
- b) de 44 reagentes que no reteste exibiram um alto

grau de sensibilidade, 77% mostrou um maior aumento para a tuberculina aviária;

- c) em somente nove casos, os animais mostraram uma maior sensibilidade à tuberculina aviária do que à mamífera.

PEARSON et alii (1977) inocularam subcutânea e intradermicamente 12 bovinos com micobactérias atípicas isoladas de bovinos, água de bebedouro e fezes de suínos. 78 dias após a inoculação, os bovinos foram tuberculinizados com tuberculinas PPDs bovina, aviária e homóloga. Todos os bovinos apresentaram reações de 4mm ou mais à tuberculina homóloga. Reações à tuberculina bovina foram relativamente pequenas e a da tuberculina aviária foram maiores que 7mm. Entretanto, as respostas às tuberculinas aviária ou homólogas registraram um máximo de reações com 72 horas.

CORNER & CATHERINE (1978a), trabalhando com bovinos infectados com micobactérias atípicas, observaram que as respostas às tuberculinas homólogas neles inoculadas decresceram entre 48 e 96 horas após inoculação. Como a diferença máxima nas respostas para as tuberculinas bovina e aviária ocorreu com 72 horas, comprovaram que o teste comparativo deverá ser lido com esse tempo para eliminar reagentes inespecíficos.

CORNER & CATHERINE (1978b), pesquisando sensibilidade inespecífica, inocularam bovinos com amostras de micobactérias atípicas originárias de bovinos. Esses animais foram tuberculinizados na 4ª e 10ª semanas após a infecção com tuberculina bovina, aviária e homóloga. A sensibilidade a todas as tuberculinas foi menor na 10ª semana de teste do que na 4ª semana.

CORNER & CATHERINE (1979) também pesquisando sensibilidade inespecífica, inocularam bovinos com nove amostras de micobactérias atípicas originalmente isoladas de amostras do solo do norte da Austrália. Na 4ª e na 10ª semana após a inoculação, os animais foram tuberculinizados com as tuberculinas bovina, aviária e homóloga. Seis amostras induziram um significativo grau de sensibilidade para a tuberculina bovina após quatro semanas de infecção, mas somente um animal apresentou resposta

na 10ª semana. Também neste experimento os pesquisadores concluíram que, em geral, o grau de sensibilidade a todas as tuberculinas declinou entre a 4ª e a 10ª semana do teste.

Em outro experimento, CORNER (1981), pesquisando o tempo de permanência de sensibilidade inespecífica, inoculou dois bovinos com micobactérias atípicas por via subcutânea. Dentro de sete dias, lesões palpáveis foram produzidas no local da inoculação. Os bovinos foram inoculados em oito ocasiões com intervalos de seis semanas durante um período de 50 semanas. Significantes sensibilizações não persistiram em nenhum animal além de 16 semanas após a inoculação.

Também LANGENEGGER et alii (1981) pesquisaram reações inespecíficas em 37 fazendas de rebanhos leiteiros da região do triângulo entre as cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte. O resultado da tuberculinização, baseado na interpretação do teste simultâneo, revelou que em 24 rebanhos não tinha tuberculose, mas que estes eram rebanhos problemas, com 9,7% dos animais apresentando reações inespecíficas. A média de aumento da espessura da pele das reações positivas dos 24 rebanhos com sensibilizações inespecíficas oscilou em torno de 4.0 mm, o que é muito baixo em comparação com a dos animais dos 13 rebanhos positivos, nos quais a média oscilou em torno de 7.5 mm. Essa baixa média das reações inespecíficas constitui-se numa das características das reações inespecíficas. Os autores alertam para o fato de que há situações em que esse critério isoladamente pode ser falho, principalmente em rebanhos onde há apenas alguns animais com tuberculose crônica, pois os animais altamente sensíveis foram eliminados em exames anteriores. Situação semelhante também pode ocorrer quando há apenas alguns animais tuberculosos e um número relativamente grande de reações inespecíficas. LANGENEGGER et alii (1981) ainda esclareceram que a sensibilização alérgica inespecífica ao teste da tuberculina bovina com 1 mg de PPD/dose se caracterizou por provocar, em vários animais, reações suspeitas e/ou fracamente positivas. Essas reações apresentaram geralmente ligeira tumefação, bastante circunscrita, consistência firme sem ou quase sem

resposta dolorosa. Na repetição da tuberculinização em 60 dias, vários animais não mais reagiram e outros que eram negativos a gora reagiram. A tuberculinização simultânea com tuberculina aviária e bovina nesses rebanhos mostra, em geral, reações iguais ou maiores para a tuberculina aviária, raramente a tuberculina bovina reage um pouco mais que a tuberculina aviária. Embora constitua valioso meio de reconhecer reações inespecíficas, a tuberculinização simultânea, com tuberculinas bovina e aviária ainda deixa certa margem de dúvida independentemente dos critérios utilizados na interpretação das reações.

3.4. Fatores predisponentes para sensibilizações inespecíficas

Vários fatores podem contribuir para que as micobactérias atípicas penetrem e se instalem no organismo animal, provocando reações paralérgicas.

HEJJ et alii (1969) demonstraram que micobactérias saprófitas veiculadas por cercárias de Fasciola hepatica durante a fase de migração até o fígado são responsáveis pela sensibilização alérgica à tuberculose.

LAMI et alii (1970) encontraram micobactérias atípicas em granulomas subcutâneos pós-vacinas de bovinos reagentes e reproduziram experimentalmente reações inespecíficas em bezerros com alguns dos germes isolados.

HUBBERT et alii (1974) relataram que traumas por insetos ou penetração de parasitos na pele ou intestinos podem melhorar as chances das micobactérias infiltrarem no hospedeiro.

LANGENEGGER et alii (1976), trabalhando com um rebanho de 327 bovinos apresentando reações inespecíficas, no Estado de São Paulo, observaram que as fezes de suínos com problemas de micobactérias atípicas eram utilizadas como esterco em capineiras que serviam como suplementação alimentar para os bovinos e a estes transmitindo as micobactérias responsáveis pela reação inespecífica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimento I

Determinação da frequência de micobactérias em nódulos da parede intestinal de bovinos, provocados por larvas de Oesophagostomum radiatum.

4.1.1. Local de trabalho

Os trabalhos de pesquisa foram realizados nas dependências da Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA, Seropédica, Rio de Janeiro, no período de março de 1983 a dezembro de 1984.

4.1.2. Material trabalhado

Trabalhou-se com uma área de 2 cm de diâmetro da mucosa do intestino de bovinos englobando um nódulo provocado pela penetração de larvas de Oesophagostomum radiatum e uma outra área com o mesmo diâmetro localizada próximo da área com nódulo.

4.1.3. Procedência do material

O material foi colhido de bovinos, a maioria vacas

de descarte, provenientes dos municípios de Bom Despacho, Barbacena, Itaúna, Brumadinho, Lagoa da Prata, Igarapé, Betim, Pedro Leopoldo, Alto Rio Doce, Cruzília, Santa Rita do Sapucaí, São Gonçalo do Sapucaí e Itajubá, situados no Estado de Minas Gerais e nos municípios de Macaé, Miracema, Nova Friburgo, Barra Mansa, Magé, Paracambi e Cantagalo, localizados no Estado do Rio de Janeiro (TAB. I). Nessas regiões, LANGENEGGER et alii (1981) encontraram a incidência de 9,7% dos animais portadores de reações inespecíficas no teste alérgico para o diagnóstico da tuberculose.

4.1.4. Número de material

Foram trabalhados um total de 800 materiais, sendo 400 englobando um nódulo e 400 sem nódulo, que serviu como controle.

4.1.5. Colheita do material

Em frigoríficos ou locais de matança avulsa, eram separados o íleo e o ceco e após abertura no sentido longitudinal, afastado o material fecal e lavagem em água corrente, era assinalada ou não a presença de nódulos com as características dos da esofagostomose. Em seguida era recortada a porção que continha o maior número de nódulos, mais frequentemente na parte final do íleo, acondicionado em sacos plásticos e em caixas isotérmicas com gelo, sendo levado dentro de poucas horas ao laboratório. A mucosa do intestino foi lavada com água corrente e imediatamente colocada e estendida sobre uma tábua com superfície lisa, limpa e desinfetada. Com auxílio de um vazador de couro, foram cortadas áreas de 2 cm de diâmetro englobando um nódulo. Logo ao lado foram colhidas áreas semelhantes sem nódulo como controle. Cada material foi identificado individualmente em pequenos sacos plásticos e estocados em congelador - 20°C até o seu manuseio bacteriológico. A porção com lesão re-

cebeu número ímpar e o seu controle número par imediatamente superior. Cada nódulo colhido era medido e descrita a sua aparência macroscópica.

4.1.6. Exame bacteriológico

No laboratório, cada material, antes de ser processado, foi descongelado e registrado o tamanho de cada nódulo pela medida de seu diâmetro. Cada porção foi mergulhada em álcool seguido de rápida flambagem a fim de eliminar possíveis germes de contaminação externa e então triturados em gral e areia estéreis, separadamente.

A descontaminação foi realizada de acordo com LANGENEGGER & LANGENEGGER (1974), utilizando solução de ácido sulfúrico a 6% na proporção de 1:6 do material durante 30 minutos, incluindo a centrifugação de 15 minutos a 500 g. O sedimento foi lavado uma vez com soro fisiológico e depois semeado em dois tubos de meio de cultura de Löwenstein - Jensen (L.J.) com glicerina (ANEXO 1). As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante dois meses, fazendo-se controles bi-semanais para registro da velocidade de crescimento, forma e coloração de colônias suspeitas. Quando estas atingiam desenvolvimento adequado, certificava-se da álcool-ácido-resistência através de esfragaços corados pelo método de Ziehl-Nielsen (ANEXO 2). Da mesma colônia foram feitas subculturas em L.J. para o processo de identificação. Após incubação por dois meses, todos os tubos de cultivo, nos quais não foi visualizado colônias de micobactérias, foram expostos sobre uma bancada em ambiente com boa luminosidade natural, a fim de que pequenas colônias velhas não pigmentadas pudessem tornar-se ligeiramente amareladas e assim facilitar sua visualização macroscópica, de acordo com as recomendações do CEPANZO (1979).

4.1.7. Comportamento bioquímico

Com um único tubo de cultura de cada amostra, com

crescimento abundante foram feitos os testes de catalase temperatura ambiente e a 68°C, além da prova de redução de nitratos, conforme técnica descrita no (ANEXO 3). Essas culturas, além do controle de velocidade de crescimento e da produção de pigmento no escuro e na luz, foram submetidas às provas de arilsulfatase rápida e lenta (ANEXO 4) e hidrólise do Tween 80* aos cinco e vinte e um dias (ANEXO 5).

4.1.8. Comportamento sorológico

Das culturas isoladas, as que bioquimicamente apresentaram características do complexo Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum, foram submetidas às provas sorológicas, conforme técnica descrita por SCHAEFER (1965).

4.1.9. Preparo do antígeno

As culturas a serem identificadas foram, inicialmente, repicadas em meio de Löwenstein-Jensen e posteriormente em Middlebrook 7H10 agar (ANEXO 6) e incubadas a 37°C por duas semanas. Ao final deste período as amostras foram suspensas, com auxílio de uma alça de platina, em salina tamponada fenicada (ANEXO 7) e inativadas a 80°C por meia hora em banho-maria. Após inativação, as culturas foram diluídas em salina fenicada, até assemelhar-se com a turvação do segundo tubo da escala de McFARLAND.

4.1.9.1. Anti-soros

Foram utilizados anti-soros preparados pela Unidade de Apoio do Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal,

* Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA.

EMBRAPA, Km 47, Rio de Janeiro, com as culturas padrões fornecidas pelo National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA.

4.1.9.2. Técnica

Para cada cultura (antígeno) a ser identificada, foram colocados em tubos de ensaio 12 x 75 mm, 0,5 ml de anti-soro na diluição adequada e 0,5 ml de antígeno. O conjunto era incubado por 24 horas, com leituras após três, cinco e 24 horas. Cada antígeno foi testado com os anti-soros produzidos a partir dos sorotipos 1, 2 e 3 de M. avium, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, de M. intracellulare e 41, 42 e 43 de M. scrofulaceum.

4.2. Experimento II

Infecção experimental de bezerros com larvas de Oesophagostomum radiatum cultivadas em meio com e sem micobactérias.

4.2.1. Preparo do bezerro "doador" para obtenção de cultura pura de Oesophagostomum radiatum

Com a finalidade de se obter número suficiente de larvas de terceiro estágio (L3) de Oesophagostomum radiatum em cultura pura, foi necessário infectar um animal denominado "doador". Foi utilizado um bezerro mestiço com idade aproximada de seis meses, pesando 70 kg. Esse animal foi desparasitado com vermífugo à base de albendazole* na dosagem de 10 mg por quilo de peso vivo, por via oral. Para confirmação da ausência de helmintos, foram feitas contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e

* Ciba Geigy Química S.A. São Paulo.



coproculturas quinzenalmente, após a evermifugação. O animal foi mantido isolado durante todo o experimento, em baia previamente desinfectada e alimentado com capim picado, proveniente de capineiras, onde não havia penetração de outros animais e uma suplementação diária de 2 kg de ração.

4.2.2. Obtenção de larvas de Oesophagostomum radiatum em cultura pura

Fêmeas adultas de Oesophagostomum radiatum foram colhidas de bezerros desmamados, abatidos em frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro. Esses parasitos foram colhidos do conteúdo do ceco com auxílio de um estilete, logo após o sacrifício dos animais. As fêmeas foram lavadas em água destilada e colocadas em um recipiente contendo uma coluna de, aproximadamente, 1 cm de meio de Eagle* (EAGLE, 1959) e incubado a 37°C em condições de fazer ovopostura. Ao final de quatro horas, foi feita a primeira coleta de ovos, através da aspiração do meio de cultura, com o auxílio de uma pipeta. Os ovos foram concentrados por decantação, para posterior processamento das coproculturas (ANEXO 8). Logo após a primeira coleta, foi repostada quantidade igual de meio ao recipiente contendo as fêmeas, para, dentro de duas horas, ser procedida a segunda coleta, obedecendo a mesma rotina. Devido ao pequeno número de fêmeas adultas obtido em cada matança de bezerros e conseqüentemente o reduzido número de ovos e de larvas destas coproculturas, foi necessário repetir por seis semanas o mesmo procedimento. Desta forma, foram conseguidas 1200 larvas, as quais foram administradas semanalmente ao bezerro "doador", em seis semanas consecutivas, imitando a infestação natural progressiva.

O bezerro começou a revelar presença de ovos e posteriormente larvas de Oesophagostomum radiatum em coprocultu-

* Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

ras após seis semanas da primeira administração de larvas(L3).

4.2.3. Obtenção de larvas (L3) de Oesophagostomum radiatum criadas em ambiente contaminado com micobactérias

Quando o "doador" estava eliminando em média 200 ovos por grama de fezes, foi colocado no animal um coletor de fezes que permitiu obter fezes sem contaminação de larvas de vida livre (contaminação do solo) e em volume suficiente para obtenção de quantidade mínima de 100.000 larvas a serem administradas a 10 animais em uma única administração.

Foram utilizados 700 gramas de fezes para obtenção de 14 culturas com 50 gramas de fezes (ANEXO 8). Em sete culturas foram incorporados 600 mg da massa úmida de uma cultura jovem de M. intracellulare sorotipo 8.

4.2.4. Obtenção de larvas(L3) de Oesophagostomum radiatum criadas em ambiente sem contaminação de micobactérias

Foram feitas coproculturas como descrito no item anterior, porém sem acrescentar micobactérias, em sete das 14 culturas.

4.2.5. Animais utilizados na infestação experimental

Foram utilizados no experimento 15 bezerros, mestiços, com grau de sangue variando entre 1/2 a 3/4 holandês-zebu. Esses animais foram selecionados do rebanho bovino da Unidade de Apoio do Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal, EMBRAPA, Km 47, Rio de Janeiro. Receberam inicialmente vermífugo à base de albendazole na dosagem de 10 mg por quilo de peso vivo, administrado uma só vez por via oral. Também foram submetidos a

uma tuberculinação comparada, a fim de selecionar animais sem nenhum tipo de hipersensibilidade às tuberculinas PPD bovina e aviária. Os animais foram tuberculinizados e suas reações interpretadas conforme técnica descrita no ANEXO 9. Após constatada ausência de parasitos gastro-intestinais e de reações às tuberculinas, esses animais foram descarrapatados e distribuídos em três grupos:

Grupo I - cinco bezerros; cada animal recebeu, por via oral, aproximadamente 10.000 larvas (L3) de Oesophagostomum radiatum, criadas em ambiente contaminado com micobactérias conforme descrito em 4.2.3.

Grupo II - cinco bezerros; recebeu cada animal a mesma quantidade de larvas e pela mesma via que o grupo I, sendo que as larvas foram criadas em ambiente sem contaminação artificial de micobactérias, conforme descrito em 4.2.4.

Grupo III - quatro bezerras e um bezerro; mantidos no mesmo ambiente dos grupos anteriores, não receberam larvas de Oesophagostomum radiatum e serviram como controles.

Todos os animais foram mantidos em baias, onde tinham acesso a pequenos piquetes gramados e recebiam a mesma alimentação do animal denominado "doador". Todos os animais foram submetidos a tuberculinação comparada (ANEXO 9) aos 33 e 93 dias após administração das larvas.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento I

Determinação da frequência de micobactérias em nódulos da parede intestinal de bovinos provocados por larvas de Oesophagostomum radiatum.

A inspeção macroscópica da mucosa intestinal do íleo e do ceco de bovinos nos locais de matança, em 20 municípios dos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais TAB. I, mostrou que 90% dos animais apresentavam pelo menos um nódulo na parede intestinal com as características da esofagostomose. Em 20% destes havia grande número de nódulos (> 20), concentrados principalmente no final do intestino delgado, denunciando ter havido nesses animais intensa e crônica infecção por Oesophagostomum radiatum.

Destas peças, foram colhidas, ao acaso, 400 amostras do intestino contendo um nódulo e, da mesma peça, uma área igual da parede intestinal sem nódulo. O exame macroscópico mostrou que as lesões nodulares faziam nítida saliência para a luz intestinal, medindo entre 1 e 19 mm de diâmetro, porém a grande maioria destes apresentavam diâmetros de dois e três milímetros. Ao corte, os nódulos maiores continham, em seu interior, massa caseosa, bastante ressecada, de coloração branco-amarela da as vezes esverdeada. Em alguns nódulos foi observado a pre-

sença de larva do Oesophagostomum radiatum. A relação do tamanho e frequência dos nódulos, bem como o número de micobactérias isoladas, está apresentado na TAB. II.

O exame bacteriológico, através da sementeira do triturado dos materiais com e sem nódulos, em dois tubos de cultura com meio de Löwenstein-Jensen, permitiu o isolamento de 42 (5,2%) culturas de micobactérias, baseado nas características culturais, tintoriais e bioquímicas. Destas 42 culturas, 30 (71,4%) foram provenientes da porção de material da parede intestinal contendo nódulo, enquanto apenas 12 (28,6%) culturas de micobactérias puderam ser isoladas das porções sem nódulo TAB. III.

A identificação das 42 culturas de micobactérias, considerando-se apenas a velocidade do crescimento da colônia bacteriana, revelou que 23 (54,8%) apresentaram crescimento rápido, enquadrando-se no grupo IV de RUNYON e consideradas bactérias saprófitas. As outras 19 (45,2%) demonstraram desenvolvimento lento, característica cultural das micobactérias dos grupos I, II e III de RUNYON, entre cujas espécies encontram-se representantes com certa patogenicidade para o homem e para os animais. A maioria (78,9%) destas 19 culturas de crescimento lento foi isolada de materiais com nódulos TAB. IV.

As características culturais, bioquímicas e sorológicas das 19 culturas de crescimento lento permitiram identificar 8 (42,1%) como Mycobacterium intracellulare, 7 (36,8%) pertencentes ao complexo M. terrae e quatro culturas (21,1%) de M. scrofulaceum TAB. V.

Baseado ainda na velocidade de crescimento e na cromogenicidade das colônias, as 42 culturas de micobactérias atípicas isoladas enquadraram-se na classificação de RUNYON TAB. VI, com quatro culturas pertencentes ao grupo II, das quais duas foram isoladas de material com lesão causada pela esofagostomose; 15 no grupo III, sendo 13 originárias de material com nódulos e 23 no grupo IV de RUNYON. Estas, consideradas não patogênicas, foram isoladas em maior número de material com nódulos.

5. 2. Experimento II

Infecção experimental em bezerros com larvas de Oesophagostomum radiatum cultivadas em ambiente com e sem mico bactérias.

Os bezerros dos grupos I e II, que foram infectados com 10,000 larvas (L3) de Oesophagostomum radiatum por animal, mostraram-se parasitados após sete semanas da administração das larvas, comprovado pela presença de ovos nas fezes e a cultura com identificação das larvas de Oesophagostomum radiatum. Nenhuma alteração clínica no estado geral de saúde dos animais foi observada nos grupos I e II após a infecção experimental em relação ao grupo III considerado testemunho.

A infecção experimental do grupo I com larvas de Oesophagostomum radiatum cultivadas em ambiente contendo Mycobacterium intracellulare, sorotipo 8, não causou sensibilização paralérgica significativa nos cinco animais do grupo, demonstrável pela tuberculinas PPD, aviária e PPD bovina aos 33 e 93 dias após a infecção. Foi verificado ligeiro aumento médio da espessura da dobra da pele na tuberculinização feita com a tuberculina PPD aviária aos 33 e 93 dias nos animais dos grupos I e II em relação aos testes feitos 30 dias antes do início do experimento TAB. VII.

TABELA I - Procedência dos materiais coletados nos municípios dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro em 1983

Estado	Município	Nº de animais coletados		
		Com nóduo	Sem nóduo	
Minas Gerais	Alto Rio Doce	18	18	
	Barbacena	7	7	
	Betim	23	23	
	Bom Despacho	11	11	
	Brumadinho	20	20	
	Cruzília	24	24	
	Igarapé	24	24	
	Itajuba	6	6	
	Itauna	6	6	
	Lagoa da Prata	12	12	
	Pedro Leopoldo	18	18	
	Santa Rita do Sapucaí	11	11	
	São Gonçalo do Sapucaí	20	20	
	Rio de Janeiro	Barra Mansa	24	24
		Cantagalo	28	28
Macaé		33	33	
Magé		24	24	
Miracema		44	44	
Paracambi		25	25	
Total		400	400	

TABELA II - Diâmetro, número de nódulos e micobactérias isoladas em fragmentos da parede do intestino de bovinos dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro em 1983

Diâmetro dos nódulos (mm)	Nº de materiais sem nódulo	Nº de materiais trabalhados sem nódulo	Culturas de micobactérias isoladas de materiais com nódulo	Culturas de micobactérias isoladas de materiais sem nódulo
1	28	28	-	-
2	137	137	12	7
3	94	94	7	1
4	54	54	6	3
5	26	26	3	1
6	19	19	-	-
7	5	5	-	-
8	20	20	-	-
9	3	3	-	-
10	10	10	1	-
15	2	2	1	-
18	1	1	1	-
19	1	1	-	-
Total	400	400	30	12

TABELA III - Frequência de micobactérias isoladas em fragmentos com e sem nódulo da pa-
rede do intestino de bovinos dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro
em 1983

Tipo de material	Positivo	Negativo	Total
Com nódulo	30 (7,5%)	370 (92,5%)	400
Sem nódulo	12 (3,0%)	388 (97%)	400
Total	42 (5,2%)	758 (94,8%)	800

TABELA IV - Distribuição das micobactérias isoladas em bovinos dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, em 1983, segundo sua velocidade de crescimento

Velocidade de crescimento	Nº de micobactérias isoladas	Nº de micobactérias em materiais com nódulo	Nº de micobactérias em materiais sem nódulo
Rápida	23 (54,8%)	15 (65,2%)	8 (34,8%)
Lenta	19 (45,2%)	15 (78,9%)	4 (21,1%)
Total	42	30	12

TABELA V - Características culturais, bioquímicas e sorológicas das micobactérias de crescimento lento isoladas de bovinos dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro em 1983

Nº da Anos- tra	Pigmento	Catalase		Nitra- to	Tween 80		Ariilsulfatase		Espécies	Soro- ti- pós
		T.A.	68°C		5	21 dias	3	14 dias		
231	-	+++	++	-	+	+	++	+++	<i>Compl. M. terrae</i>	**
244	-	++	+	+++	+	+	++	+++	<i>Compl. M. terrae</i>	**
269	-	+++	+	-	+	+	+	++	<i>M. intracellulare</i>	9
291	-	++	+	-	-	-	+	+	<i>M. intracellulare</i>	6
457	-	+++	++	-	+	+	+	++	<i>Compl. M. terrae</i>	**
487	-	+++	++	-	+	+	+	++	<i>Compl. M. terrae</i>	**
489	-	+++	++	-	+	+	++	++	<i>Compl. M. terrae</i>	**
491	+	++	+	-	-	-	++	++	<i>Compl. M. terrae</i>	**
493	+	+++	+++	-	-	-	+++	++++	<i>M. scrofulaceum</i>	*
479	-	+++	+	+++	+	+	+	++	<i>M. scrofulaceum</i>	*
514	-	+++	+	-	+	+	++	++	<i>Compl. M. terrae</i>	**
519	-	++	+	-	+	+	+	++	<i>M. intracellulare</i>	*
531	-	+++	++	-	-	-	++	+++	<i>M. intracellulare</i>	16
705	-	++	+	+++	-	-	+	++	<i>Compl. M. terrae</i>	**
706	+	+++	+	-	-	-	+	++	<i>M. intracellulare</i>	15
713	-	+++	+	-	-	-	+++	+++	<i>M. scrofulaceum</i>	*
715	-	+++	+	-	-	-	++	++	<i>M. intracellulare</i>	9
722	+	++	+	-	-	-	+	+	<i>M. intracellulare</i>	9
729	-	+++	+	-	-	-	++	++	<i>M. scrofulaceum</i>	*
							++	++	<i>M. intracellulare</i>	8

* Não tipáveis sorologicamente

** Não identificadas sorologicamente

- Sem alteração

+ Fraca

++ Média

+++ Forte

++++ Intensa

T.A. Temperatura ambiente

TABELA VI - Distribuição das micobactérias isoladas em bovinos dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro em 1983, segundo classificação de RUNYON (1959)

Grupos	Nº de micobactérias em materiais com nódulo	Nº de micobactérias em materiais sem nódulo	Total de Micobactérias isoladas
I	-	-	-
II	2	2	4
III	13	2	15
IV	15	8	23
Total	30	12	42



TABELA VII - Resultados das tuberculinizações executadas nos três grupos de animais utilizados no experimento II, Rio de Janeiro, 1983

Grupo	Animal	Tuberculinizações					
		30 dias antes do início experimento		33 dias após início experimento		93 dias após início experimento	
		*Dif. Aviária	*Dif. Bovina	*Dif. Aviária	*Dif. Bovina	*Dif. Aviária	*Dif. Bovina
I	1	0,8	0,9	0,4	0,4	0,5	0,6
	2	0,1	0,3	1,7	0,4	0,5	0,6
	3	1,0	0,8	1,4	0,4	0,1	0,1
	4	0,2	0,2	1,0	0,0	1,4	0,1
	5	0,1	0,7	0,0	0,1	0,5	0,5
II	1	0,9	0,1	0,9	0,5	1,5	0,1
	2	0,2	0,1	0,4	0,2	1,2	0,5
	3	0,5	0,4	0,9	0,1	0,8	0,4
	4	0,0	0,1	1,0	0,2	**	**
	5	0,2	0,2	0,0	0,1	0,6	1,0
III	1	0,5	0,4	0,1	0,0	0,6	1,0
	2	0,0	0,0	0,2	0,2	0,3	0,1
	3	0,8	0,3	0,5	0,3	0,2	0,0
	4	0,6	0,7	0,3	0,1	0,4	0,2
	5	0,0	0,1	0,1	0,0	**	**

* Diferença em (mm) da dobra da pele após tuberculinização.

** Os animais número 4 e 5 dos grupos II e III, morreram antes da terceira tuberculinização.

6. DISCUSSÃO

6.1. Experimento I

Determinação da freqüência de micobactérias em nódulos da parede intestinal de bovinos, provocados por larvas de Oesophagostomum radiatum.

Na década passada as pesquisas em tuberculose se concentravam principalmente na área das micobactérias "atípicas". Dentro deste assunto os trabalhos se desenvolviam procurando principalmente o esclarecimento de seu reservatório na natureza, das espécies predominantes dos problemas econômicos e sanitários causados por estes microrganismos.

No Brasil, este estudo foi iniciado por GONTIJO(1972) que procurou isolar e identificar micobactérias presentes no solo do Estado do Rio de Janeiro.

Buscando identificar as principais micobactérias responsáveis por sensibilizações inespecíficas em animais e sua distribuição no Brasil, LANGENEGGER & LANGENEGGER (1974), LANGENEGGER et alii (1975), LANGENEGGER et alii (1976) LANGENEGGER & LANGENEGGER (1976), trabalharam principalmente com suínos, que são considerados por LANGENEGGER (1974) como eficiente sentinela epidemiológica em regiões rurais para a tuberculose humana, bovina e aviária. Ao mesmo tempo possibilita denunciar a existência, no meio em que vive de outras micobactérias facul-

tativamente patogênicas para o homem e os animais.

Em bovinos, os maiores problemas dessas micobactérias são causados quando se observam reações inespecíficas, constituindo-se problemas de diagnóstico alérgico, provocando descartes excessivos em várias partes do mundo (TRAUM, 1916, 1919; ROBERTSON & HOLE, 1937; KARLSON, 1962; RUSHFORD, 1966; SCHLIESSER, 1970; LAMI et alii 1970; PEARSON et alii 1977).

No Brasil, o problema das reações inespecíficas em bovinos ficou definitivamente demonstrado nas principais bacias leiteiras com os trabalhos de LANGENEGGER et alii (1976, 1981), quando foi comprovado que o complexo M. intracellulare-scrofulaceum é o principal responsável por reações paralérgicas na região sudeste do Brasil. Procurou-se, neste experimento, esclarecer como as micobactérias poderiam chegar ao organismo animal a ponto de provocar reações paralérgicas.

Após examinar bacteriologicamente nódulos provocados pela penetração de larvas L3 de Oesophagostomum radiatum na parede intestinal de bovinos, encontrou-se na presente pesquisa um maior número de micobactérias em nódulos com relação a igual número de materiais controles aparentemente sem lesão TAB. III. Esse resultado bacteriológico está de acordo com a hipótese de HUBBERT et alii (1974), em que relata serem traumas por insetos ou penetração de parasitos na pele ou na mucosa entérica responsáveis pela penetração de micobactérias atípicas no organismo, no entanto, o diâmetro dos nódulos não guardam relação com o número de micobactérias isoladas TAB. II.

Das micobactérias isoladas, a maioria (54,8%), se enquadra no grupo IV de rápido crescimento, às quais são atribuídas pouco poder sensibilizante (RUNYON, 1974).

Na TAB. IV, ainda pode-se verificar que a maioria das micobactérias de crescimento lento (78,9%), foram isoladas de materiais com nódulo, o que pode ser atribuído à maior patogenicidade dessas micobactérias, conforme achados de LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1981.

O pequeno número (5,2%) de micobactérias nos mate-

riais contendo nódulos da esofagostomose bovina encontrado na presente pesquisa pode, a primeira vista, parecer contraditório com o percentual de 9,7% de animais portadores de sensibilização paralérgica observado por LANGENEGGER et alii (1981) em bovinos da mesma região. Ainda mais, porque acima de 50% das micobactérias isoladas são consideradas saprófitas com pouco poder de sensibilização. No entanto, como de cada animal foi colhido apenas um segmento com um nódulo, escolhido ao acaso e como em cerca de 20% dos animais examinados foi encontrado um grande número de nódulos parasitários, é provável que este compense o reduzido número de nódulos portador de micobactérias com capacidade sensibilizadora.

Cumprе ressaltar ainda que a sensibilização paralérgica via nódulo da esofagostomose pode ser apenas uma dentre várias portas de entrada de micobactérias no organismo do bovino. LANGENEGGER & LANGENEGGER (1976) assinalaram a presença de micobactérias atípicas nas amígdalas e linfonodos da cabeça de bovinos que podem sensibilizar o organismo animal.

6.2. Experimento II

Infecção experimental em bezerros com larvas de Oesophagostomum radiatum cultivadas em ambiente com e sem micobactérias.

As larvas de Oesophagostomum radiatum, normalmente vivem em ambientes semelhantes aos quais (KUBICA et alii 1963, WOLINSKY & RYNEARSON, 1968, KAZDA, 1970; CRISTOVÃO, 1976; FONSECA, 1976; CORNER & CATHERINE, 1979; NIAZ & SIDDIQI, 1979; SONGER, 1980; GEORGE et alii 1980 e KETTERER et alii 1981) descrevem como sendo o possível reservatório de micobactérias atípicas. Vivendo nesse ambiente, nos seus dois primeiros estágios, as larvas de Oesophagostomum radiatum, poderiam ingerir micobactérias atípicas existentes nesses locais, juntamente com a matéria orgânica, da qual se alimentam em seus dois primeiros estágios ou mesmo carrear mecanicamente as micobactérias até o organismo animal.

Neste experimento, procurou-se provocar uma sensibilidade alérgica em bezerros, através da administração de larvas L3 de Oesophagostomum radiatum, criadas artificialmente em culturas contaminadas com M. intracellulare, conhecidamente com poder sensibilizante para animais SAITANU & HOLMGAARD 1977, e bastante disseminada em nosso meio (LANGENEGGER et alii 1976; LANGENEGGER & LANGENEGGER 1981).

Ao grupo I de animais, nos quais tentou-se reproduzir sensibilizações inespecíficas, foi administrado a cada animal 10.000 larvas de Oesophagostomum radiatum que, segundo BEEMNER 1969; HEJJ et alii 1969, seria quantidade suficiente de larvas para uma boa infecção experimental. Os animais dos grupos I, II e III, que foram tuberculinizados em duas ocasiões após início do experimento, não apresentaram sensibilizações que tivessem as características das reações paralérgicas descritas por (KLEEBERG 1960; RUSHFORD 1966; PEARSON et alii 1977; FODSTAD, 1977; CORNER et alii 1978a e b; CORNER & CATHERINE, 1979 e CORNER 1981, conforme TAB. VII.

Essa falha pode ser atribuída ao modelo experimental adotado que previu a infecção única de 10.000 larvas em bezerros previamente desparasitados. A falta de sensibilização prévia do organismo dos bezerros pode ter impedido a formação de nódulos. Na natureza, os animais infestam-se com doses repetidas durante períodos variáveis, tornando a infestação crônica. Nesta circunstância ocorre o maior número de nódulos decorrente da retenção de larvas na parede intestinal, como os animais não puderam ser sacrificados no final do experimento esta parte não pode ser esclarecida.

Os bezerros dos grupos I e II apresentaram um aumento médio da espessura da pele sem, contudo, apresentar reação suspeita ou positiva na tuberculinização. Isto pode estar associado ao fato de a infecção artificial do Oesophagostomum radiatum não ter sido adequada pois, apesar da inoculação de 10.000 larvas por animal, não houve evidência clínica da parasitose, o que relata BREMNER (1969).

7. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados e nas condições em que foi conduzida esta pesquisa, pode-se concluir que:

a) as larvas de Oesophagostomum radiatum penetram na mucosa do intestino bovino, podendo com isso carrear micobactérias atípicas encontradas normalmente na luz intestinal;

b) que esta veiculação de bactérias da luz intestinal para o organismo pode levar a sensibilização dos animais;

c) que o tamanho do nódulo não está diretamente relacionado com o isolamento de micobactérias atípicas;

d) uma só infecção com Oesophagostomum radiatum de animais livres não é suficiente para a formação de nódulos e consequentemente a sensibilização pelo micobacterium;

e) há presença mais freqüente das micobactérias de crescimento lento em nódulos de Oesophagostomum radiatum do que aquelas de crescimento rápido;

f) que a maior freqüência de bactérias de crescimento lento em nódulos sugere uma possibilidade maior de sensibilização dos animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, L. Diagnóstico bacteriológico da tuberculose. Rev. Microbiol., São Paulo, 1(1):43-60, 1970.
2. ANDRADE, L. & SANTIAGO, E.A.C. Micobactérias não tuberculosas (atípicas) na Guanabara. Rev. Div. Nac. Tuberc., Rio de Janeiro, 15:124-45, 1971.
3. ANERIK, A.I. Estudio experimental sobre el diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante pruebas de cultivo e inoculación animal. Cienc. Vet., Maracaibo, 4(1):137-200, 1974.
4. BAUMAN, R.; KRENN, E.; LIEBISCH, H. Histologische Untersuchungen über die kasige lymphknoteneutziindung des schweines. Wien. Tieraerztl. Monatsschr., Horn, 42:34-8, 1955a.
5. BAUMANN, R.; KRENN, E.; LIEBISCH, H. Die kasige lymphknoteneutzundung des scweine. III. Ubertragungsversuche. Wien. Tieraerztl. Monatsschr., Horn, 42:209-15, 1955b.
6. BAUMANN, R.; KRENN, E.; LIEBISCH, H. Die kasige lymphknoteneutzundung der schweine IV. Bakteriologische untersuchungeu. Wien. Tieraerztl. Monatsschr., Horn, 42:546-9, 1955c.
7. BAUMANN, R.; KRENN, E.; LIEBISCH, H. Uberdie kasige lymphknoteneutzundung der schweine V. tierversuche mit reinkultureu. Wien. Tieraerztl. Monatsschr., Horn, 43:341-5, 1956.

8. BOUGHTON, E. Tuberculosis caused by Mycobacterium avium. Vet. Farnham Royal, 39(7):457-65, 1969.
9. BREMNER, K.C. Pathogenetic in experimental bovine oesophagostomosis. IV. Exudative enteropathy as a cause of hypoproteinemia. Exp. Paras. New York, 25:382-94, 1969.
10. CATHERINE, W.P.B.; CORNER, L.A.; LEPPER, A.W.D. Tuberculin sensitivity of cattle inoculated with atypical mycobacteria isolated from cattle, feral pigs and trough water. Aust. Vet. J., Brunswick, 53(2):67-71, 1977.
11. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, Ramos Mejia. Bacteriologia de la Tuberculosis, Buenos Aires, 1979. 63p. (Nova Técnica, 11).
12. CORNER, L.A. The duration of the response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria. Aust. Vet. J., Brunswick, 57(5):216-9, 1981.
13. CORNER, L.A. & CATHERINE, W.P. Pathogenicity of cattle of atypical mycobacteria isolated from feral pigs and cattle and the correlation of lesions with tuberculin sensitivity. Aust. Vet. J., Brunswick, 54(6):280-6, 1978a.
14. CORNER, L.A. & CATHERINE, W.P. Response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria of bovine origin. Aust. Vet. J., Brunswick, 54(8):379-82, 1978b.
15. CORNER, L.A. & CATHERINE, W.P. Response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria of bovine origin. Aust. Vet. J., Brunswick, 55(1):6-9, 1979.
16. CRISTOVÃO, E.D.M. Hipersensibilidade tuberculínica específica e inespecífica em escolares na cidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1976. 93p. (Tese).
17. EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, Paris, 130:432-7, 1959.
18. EVERITT, J.; ACLAND, H.M.; WHITLOCK, R.H. Mycobacterial

- infections in swine. Calif. Vet., Moraga, 36(3):16-8, 1982.
19. FLEISCHMAN, R.W.; MOULIN, G.C.; ESBER, H.J.; ILIEVSKI, V.; BODGEN, A.E. Nontuberculous mycobacterial infection attributable to mycobacterium intracellulare serotype 10 in two Rhesus monkeys. J. Am. Vet. Med. Assoc. Schaumburg., 181(11):1358-62, 1982.
20. FODSTAD, F.H. Tuberculin reaction in bulls and boars sensitized with atypical mycobacteria from sawdust. Acta. Vet. Scand, Copenhagen, 18(3):374-83, 1977.
21. FONSECA, L.S. Estudo bacteriológico de micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1976. 96p. (Tese).
22. FRANCIS, J.; CHOI, C.L.; FROST, A.J. The diagnosis of tuberculosis in cattle with special reference to bovine. PPD tuberculin. Aust. Vet. J. Brunswick, 49(5):246-51, 1973.
23. GEORGE, K.L.; PARKER, B.C.; GRUFT; FALKINHAM, J.O. Epidemiology of infection by non tuberculous mycobacteria. II Growth and survival in natural waters. Am. Rev. Resp. Dis. New York, 122(1):89-94, 1980.
24. GILLESPIE, J.H. & TIMONEY, J.F. Hagan and Bruner's infections diseases of domestic animals. 7. ed. Ithaca Cornell University, 1981. 851p.
25. GONTIJO, F.P.P. Isolamento e identificação de micobactérias do solo. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1972. 269p. (Tese, Doutorado).
26. HAAS, H.; ROSENMAN, E.; WEBER, D.; SACKS, T.G. The pathogenicity of atypical mycobacteria for guinea pigs. Pathol. Microbiol., Basel, 31(193-201), 1968.
27. HEJJ, L.; NYREDY, I.; TUBOLY, S. Uber die rolle der leberregel in der ausbildung der tuberkulinallergie bei Rindern. Zentralbl. Bakteriol. I. Orig., Stuttgart, 210:387-96, 1969.

28. HOLE, N.H. & HULSE, E.C. The skin lesions of bovine tuberculin reactors, second. Report. J. Comp. Pathol. Therap., New York, 52:201-21, 1939.
29. HUBBERT, T.W. & McCULLOCH, F.W. SCHNUNEMBERGES, R. P. ; THOMAS, C.C. Diseases transmitted from animals to man. 6thed. Springfield, Thomas, 1974. 1206p.
30. KANTOR, I.N.; VEGA, E.; CABELLERO, P.; PINANEZ, D. Examination of organs from cattle condemned because of tuberculosis at abattoirs in Buenos Aires city. Rev. Med. Vet. Arg., Buenos Aires, 62(4):282-5, 1981.
31. KARLSON, A.G. Nonspecific or cross - sensitivity reactions to tuberculin in cattle. Adv. Vet. Sci., New York, 7:147-81, 1962.
32. KAZDA, J. Importância de las micobactérias atípicas en medicina veterinária. Rev. Enciclopédia Vet., Fasc. 229,1970.
33. KETTERER, P.J.; ROGERS, R.J.; DONALD, B. Pathology and tuberculin sensitivity in cattle inoculated with Mycobacterium avium complex, serotypes 6, 14 and 18. Aust. Vet. J., Brunswick, 57(2):61-5, 1981.
34. KLEEBERG, H.H. The tuberculin test in cattle. J.S.Afr. Vet. Med. Assoc., Pretoria, 31(2):213-25, 1960.
35. KUBALA, E. Some aspects of diseases caused by atypical mycobacteria. Scand. J. Resp. Dis. Copenhagen, 80:14-6 , 1972.
36. KUBICA, G.P. & VESTAL, A.L. The arylsulfatase activity of acid-fast bacilli. Am. Rev. Resp. Dis., New York, 83:728, 1961.
37. KUBICA, G.P.; BEAM, R.E.; PALMER, J.W. A method of the isolation of unclassified acid fast bacilli from soil and water. Am. Rev. Resp. Dis., New York, 88:718-20, 1963.
38. LAMI, G.; KARDEVAN, A.; IVANYI, T.S.; GONYE, S.; TUBOLY, S. Settlement of mycobacteria in albuminum hydroxide-indu-

- ced cutaneos granuloma of cattle. Acta. Vet. Acad. Sci., Budapest, 20:91-102, 1970.
39. LANGENEGGER, C.H. & LANGENEGGER, J. Linfadenites cervicais tuberculosas e pseudotuberculosas em suínos de abate de Pernambuco. Pesq. Agropec. Ser. Vet. Brasília, 9(7):33 - 40, 1974.
40. LANGENEGGER, C.H. & LANGENEGGER, J. Micobactérias atípicas isoladas de amígdalas e linfonodos de bovinos. Pesq. Agropec. Bras. Ser. Vet., Brasília, 11(9):37-42, 1976.
41. LANGENEGGER, C.H. & LANGENEGGER, J. Prevalência e distribuição dos sorotipos de micobactérias do complexo MAIS isoladas de suínos no Brasil. Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, 1(3):75-80, 1981.
42. LANGENEGGER, J. & LANGENEGGER, C.H.; MOTA, P.M.P.C.; LEITE, R.C. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, 4(1):145-9, 1981.
43. LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; RAMOS, A.A. Reações inespecíficas no diagnóstico da tuberculose em bovinos causados por Mycobacterium intracellulare. Pesq. Agropec. Bras. Ser. Vet., Brasília, 11(9):65-71, 1976.
44. LANGENEGGER, C.H.; LEITE, R.C.; LANGENEGGER, J.; RIBEIRAL, L.A. Linfadenites tuberculoides em suínos de abate da região de Brasília. Pesq. Agropec. Bras. Ser. Vet., Brasília, 10:61-4, 1975.
45. MCGAVIN, M.D.; MALLMANN, V.H.; MALLMANN, W.L.; MORRIL, C. C. Pathological changes in calves infected intradermally with Mycobacterium intracellulare serotype Davis and Mycobacterium avium serotype 2. Vet. Pathol. Washington, 14(1):56-66, 1977.
46. MAGALHÃES, M. Frequência das micobactérias atípicas no Recife. Rev. Serv. Nac. Tuberc. Rio de Janeiro, 10:217-23, 1966.

47. MANNINGER, R.; & MOCSY, J. Patologia y terapeutica especiales de los animales domesticos. 3ª ed. Barcelona, Labor, 1973. 872p.
48. MERKAL, R.S. & CRAWFORD, J.A. Heat inactivation of Mycobacterium avium intracellulare complex organisms in aqueous suspension. Appl. Environ. Microbiol. Washington, 38(5):827-30, 1979.
49. NIAZ, N. & SIDDIQ, S.H. Isolation and identification of mycobacteria from cattle slaughtered in Pakistan. Vet. Rec., London, 104(21):478-80, 1979.
50. PEARSON, C.W.; CORNER, C.A.; LEPPER, A.W.D. Tuberculin sensitivity of cattle inoculated with atypical mycobacteria isolated from cattle, feral pigs and trough water. Aust. Vet. J., Brunswick, 53(2):67-71, 1977.
51. PORTUGAL, M.A.S.C.; PIMENTEL, J.N.; SALIBA, A.M.; BALDASSI, L.; SANDOVAL, E.F.D. Ocorrência de Paratuberculos no Estado de Santa Catarina. Biológico, São Paulo, 45(1/2) : 19-24, 1979.
52. PRITCHARD, D.G.; STANFORD, J.C.; PAUL; R.C.A. A preliminary study of delayed hypersensitivity to Mycobacterium chelonae, fortuitum. (RANAE) and Mycobacterium gordonae in cattle from two areas in Uganda. Br. J. Exp. Pathol., London, 55(4):374-83, 1974.
53. REZNIKOV, M. Atypical mycobacteria, their classification identification and aetiological significance. Med. J. Aust., Glebe, 1:553-6, 1970.
54. ROBERTS, F.H.S. & O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. Aust. J. Agric. Rec. Melbourne, 1(1):99-102, 1950.
55. ROBERTSON, A. & HOLE, N.H. A preliminary report on the problem of the bovine skin - lesion tuberculin - reactor. J. Pathol. Therap., New York, 50:34-57, 1937.
56. ROSSI, L. Allergy dynamics in cattle experimentally sensitized

- with some atypical mycobacteria. Acta. Vet. Brno., Prague, 44(4):337-84, 1974.
57. RUNYON, E.H. Anonymus mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. Am., Philadelphia, 43:273-90, 1959.
 58. RUNYON, E.H. Ten mycobacterial pathogens. Tubercle, London, 55(3):235-40, 1974.
 59. RUSHFORD, B.H. Non-specific reactors to the single caudal fold tuberculin test in dairy cattle in Victoria. Aust. Vet. J., Brunswick, 42:70-3, 1966.
 60. SAITANU, K. & HILMGARRAD, P. An epizootic of Mycobacterium intracellulare, serotype 8, infection in swine. Nord. Veterinaermed., Copenhagen, 29(4/5):221-6, 1977.
 61. SCHAEFER, W.B. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am. Rev. Resp. Dis., New York, 99:85-93, 1965.
 62. SCHLIESSER, T. Micobactérias atípicas y reacciones tuberculínicas inespecíficas. Rev. Enciclopédia Vet. Fasc. 229, 1970.
 63. SELKON, J.B. Atypical mycobacteria: a review. Tubercle, London, 50:70-8, 1969.
 64. SHIMUZU, K. & TSUKAMURA, M. Slowly growing scotocromogenic mycobacteria isolated from a bovine nodular thelitis lesion. Jap. J. Microbiol., Tokyo, 18(3):259-61, 1974.
 65. SONGER, J.G. Environmental sources of Mycobacterium avium for infection of animals and man. Proc. M. S. Anim. Health Assoc., Richmond, 84:528-35, 1980.
 66. THOEN, O.C.; KARLSON, A.C.; RANNEY, A.F. Epidemiology of infection with serotypes of Mycobacterium avium complex in swine and other species. Proc. M. S. Anim. Health Assoc., Richmond, 76:423-36, 1972.
 67. THOEN, C.O.; JOHNSON, D.W.; HIMES, E. M.; MENKE.; S.B. MUSCO PLAT, C.C. Experimentally induced Mycobacterium avium

- serotype 8. Infection in swine. Am. J. Vet. Research. Schaumburg, 37(2):177-81, 1976.
68. THOEN, C.O.; OWEN, W.J.; HIMES, E.M. Mycobacterium avium serotype 4 infection in swine. Proc. the U. S. Anim. Health Assoc., Richmond, 83:468-79, 1979.
69. TUFFLEY, R.E.; LEGGO, J.H.; SIMMONS, G.C.; TAMMEMAGI, L. Studies on the virulence of Mycobacterium intracellulare serotype VI for pigs. J. Comp. Pathol., New York, 83(4):467-71, 1973.
70. TRAUM, J. Case reports of lymphangitis in cattle caused by an acid-alcoholic fast organism. J. An. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 49(2):254-7, 1916.
71. TRAUM, J. Further report on lymphadenitis in cattle caused by acid-alcohol fast organism. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 55(8):639-52, 1919.
72. WAYNE, L.G. Differentiation of mycobacteria by their effect on tween 80. Am. Rev. Resp. Dis., New York, 86:579, 1962.
73. WOLINSKY, E. & RYNEARSON, T.K. Mycobacteria in soil their relation to disease associated strains. Am. Rev. Resp. Dis., New York, 97(1):1032-7, 1968.
74. WORTHINGTON, R.W.; KLEEBERG, H.H. Practical problems in tuberculin testing in cattle. J. S. Afr. Vet. Med. Assoc., Pretoria 39(2):191-6, 1965.
75. YACHIDA, S.; SHIMIZU, K.; HOROSE, T.; SATO, M. Studies on mycobacteria isolated from skin lesion tuberculosis of bovine udder. Jap. J. Vet. Sci., Tokyo, 35(5):357-65, 1973.



ANEXO 1

Meio de Löwenstein-Jensen (CEPANZO, 1979)

1. Solução A

Fosfato monopotássio.....	2,50 g
Sulfato de magnésio.....	0,24 g
Citrato de magnésio.....	0,60 g
Asparagina.....	3,60 g
Glicerina bidestilada.....	12,0 ml
Água destilada q.s.p.....	600 ml

Colocar a solução acima em um balão de 2 litros e aquecer até dissolução, esterilizar em autoclave a 121°C por 20 minutos.

2. Solução B

Solução aquosa de verde malaquita a 2%..... 20 ml
Esterilizar 30 minutos em vapor fluente.

3. Ovos

Ovos inteiros (20-22 ovos)..... 1.000 ml

Limpar os ovos cuidadosamente com água e sabão, e mergulhos durante uma hora em álcool 96° GL. Os ovos são a seguir quebrados e colocados em uma proveta graduada estéril até obtenção do volume de 1.000 ml. Homogeneizar em um balão com

pérolas de vidro.

Após homogeneização, verter a mistura de ovos através de uma gaze estéril na solução A. Juntar 20 ml da solução B e misturar bem. Distribuir asépticamente em tubos de ensaio com tampa de rosca e coagular em forno a 85-90°C em posição inclinada durante 90 minutos.

ANEXO 2

Coloração de Ziehl-Neelsen

1. Preparo de esfregaços

As lâminas devem ser novas, desengorduradas por imersão em álcool-ácido sulfúrico 1:1000. Com uma alça de platina, o material a ser examinado é espalhado em camada delgada por movimentos longitudinais e transversais, formando um triângulo em 2/3 da lâmina. Deixar secar ao ar e fixar passando na chama rapidamente por duas ou três vezes.

2. Coloração

Imediatamente após a fixação, procede-se a coloração da lâmina obedecendo o seguinte esquema:

- a) 1º tempo - colocar a lâmina sobre um suporte de metal ou vidro. Cobri-la com fuccina de Ziehl filtrada recentemente. Deixar agir 10 minutos, aquecendo brandamente duas ou três vezes até a emissão de vapores, com chama obtida por meio de algodão montado em arame molhado no álcool, evitando-se a fervura e a secagem do corante. Se necessário colocar mais corante para manter a lâmina coberta.
- b) 2º tempo - derramar o corante e lavar imediata-

mente com água corrente. Recobrir com álcool clorídrico a 3% durante 3 minutos e lavar. O esfregão deve ficar incolor ou ligeiramente róseo.

- c) 3º tempo - corar durante 30 segundos com solução de azul de metileno filtrada recentemente em papel de filtro. Lavar com água corrente, deixar secar e examinar ao microscópio com objetiva e imersão 100 X e ocular 10 X.

3. Corantes

a) Fucsina de Ziehl

Fucsina básica.....	1 g
Álcool absoluto.....	10ml

Dissolver por agitação e acrescentar:

Fenol aquoso.....	5,5 g
-------------------	-------

Continuar agitando e acrescentar:

Água destilada.....	100ml
---------------------	-------

Deixar repousar 24 horas e depois filtrar em papel. O fenol aquoso é preparado dissolvendo-se 1 kg de fenol cristalizado em 100 ml de água destilada. Aquecer em banho-maria até dissolver e deixar esfriar.

3.1. Azul de metileno fenicado

Azul de metileno.....	2 g
Álcool absoluto.....	10 ml

Dissolver por agitação e juntar:

Água destilada.....	100 ml
---------------------	--------

3.2. Álcool clorídrico

Ácido clorídrico.....	3 ml
Álcool absoluto.....	97 ml

ANEXO 3

Teste da catalase e nitrato - redutase com um tubo de cultura (ANDRADE, 1970)

Sequência das operações

- a) Colocar 2 ml de tampão de fosfatos M/15, pH 7.0 (Anexo 3.1), com 0,1% de nitrato de sódio no tubo de cultura, de modo que o tampão fique banhando as culturas.
- b) Incubar em estufa ou banho-maria durante 2 horas a 37°C.
- c) Com auxílio de uma alça de platina, suspender e triturar as culturas na solução tampão de fosfatos.
- d) Retirar aproximadamente 1,0 ml de suspensão bacilar e colocar 0,5 ml em cada um de dois tubos de hemólise.
- e) Colocar uma série de tubos de hemólise no banho-maria a 68°C por 30 minutos.
- f) Retirar os tubos do banho-maria, resfriar e proceder ao teste da catalase e da termoinativação (Anexo 3.2).
- g) Retornar os tubos de cultura, com o restante do

tampão à estufa 37°C até completar 4 horas e proceder ao teste da nitrato - redutase (Anexo 3.3).

ANEXO 3.1

Solução de fosfatos M/15 pH 7.0

Solução A (Alcalina)

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ (anidro)..... 9,46g/litro de água destilada
ou

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$11,83g/litro de água destilada
ou

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$23,88g/litro de água destilada

Solução B (Ácida)

KH_2PO_4 9,07g/litro de água destilada

Para cada 1.000 ml da solução tampão de fosfatos
pH 7.0, misturar:

611 ml da solução A

389 ml da solução B

ANEXO 3.2

Teste da catalase e termo-inativação (ANDRADE, 1970)

Reagentes

A - solução aquosa de Tween 80 a 10%

B - água oxigenada 30 volumes

Os reagentes A e B são misturados em partes iguais e mantidos em geladeira até o momento do uso.

Técnica

1. Catalase à temperatura ambiente

0,5 ml suspensão da cultura (ANEXO 3, item d)

0,5 ml da solução Tween 80* - água oxigenada

2. Termo-inativação da catalase

0,5 ml suspensão da cultura aquecida (ANEXO 3, item e)

0,5 ml da solução Tween 80 - água oxigenada

Leitura

As leituras da catalase à temperatura ambiente e termo-inativação da catalase são feitas da mesma maneira. Verificar o desprendimento de pequenas bolhas após a adição da solução Tween 80 - água oxigenada. A intensidade da reação pode ser expressa de 1 a 3 cruces de acordo com a altura da coluna gasosa.

* Sigma Chemical Company St Louis M.O. USA

ANEXO 3.3

Teste da nitro-redutase (ANDRADE, 1970)

Reagentes

- A - Tampão de fosfatos M/15 pH 7.0 com 0,1% de nitrato de sódio
- B - Ácido clorídrico concentrado
- C - Solução aquosa de sulfanilamida a 0,2%
- D - Solução aquosa de alfa-naftilamina a 0,1%

Técnica

O teste é feito no próprio tubo com o restante do tampão nitrato, após incubação durante 4 horas a 37°C.

- Pingar uma gota de ácido clorídrico concentrado sobre a cultura
- 4 gotas da solução de sulfanilamida 0,2%
- 4 gotas da solução de alfa-naftilamida a 0,1%

Leitura

O aparecimento de cor vermelha é indicativo da reação positiva, cuja intensidade varia do róseo ao vermelho intenso, podendo ser expressa de uma a quatro cruces.

ANEXO 4

Teste da arissulfatase (KUBICA & VESTAL, 1961)

Uma alça de platina de cultura jovem em Löwenstein-Jensen, é suspensa em um tubo de ensaio 16 x 125 mm contendo 2 ml de meio de Dubos (ANEXO 4.1) e incubado a 37°C por sete dias, após os quais o crescimento é usado como inóculo para as duas seguintes soluções:

A - Uma solução de substrato a 0,001 M é preparada pela adição de 2,5 ml de uma solução estoque a 0,08 M de disulfato de tri-potássio fenolftaleína (ANEXO 4.2.) em 200 ml do meio completo de Dubos e distribuição asseptivamente em quantidades de 2 ml em tubos de ensaio 16 x 125 mm, verificando a esterilidade por 24-48 horas de incubação a 37°C. Esta concentração é usada para o teste de 3 dias.

B - Uma solução de substrato a 0,003 M é preparada por adição de 7,5 ml de solução estoque a 0,08 M de disulfato de tri-potássio fenolftaleína em 200 ml de meio de Dubos completo. A distribuição é feita em tubos de ensaio 16 x 125 mm e verificada a esterilidade por 24-48 horas de incubação a 37°C. Esta concentração é usada para o teste de duas semanas.

Técnica

Uma alíquota de 0,3 ml do inóculo crescido no meio

completo de Dubos é usada para cada concentração de substrato 0,001 M e 0,003 M e os tubos de ensaio incubados a 37°C. Após 3 dias, 6 gotas de uma solução a 2 N de carbonato de sódio (10,6 g de Na₂CO₃ em 100 ml de água destilada), são adicionadas ao substrato 0,001 M. Após duas semanas de incubação 6 gotas da solução 2 N de carbonato de sódio são adicionadas ao substrato 0,003 M.

A troca de cor do substrato deverá ser registrada imediatamente. O *M. fortuitum* é incluído como controle positivo e um tubo não inoculado com substrato o controle negativo. A troca de cor é notada visualmente e a interpretação feita da seguinte maneira:

+	cor de rosa fraco
+	rosa pálido
++	rosa
+++	vermelho fraco
++++	vermelho
+++++	vermelho forte

ANEXO 4.1

Meio de Dubos

No meio básico de Dubos é usada a seguinte composição por litro:

Bacto-asparagine.....	2,0 g
Bacto-casitone.....	0,5 g
Fosfato dissódico.....	2,5 g
Fosfato monopotássico.....	1,0 g
Citrato amônio-fênico.....	50 mg
Sulfato de magnésio 7 H ₂ O.....	10 mg
Cloreto de cálcio.....	0,5 mg
Sulfato de zinco 7 H ₂ O.....	0,1 mg

Sulfato de cobre 5 H ₂ O.....	0,1 mg
Tween 80.....	0,2 mg

O meio básico de Dubos é distribuído em alíquotas de 180 ml em erlenmeyr's e esterilizado em autoclave 15 minutos a 121°C e estocado a 4°C. No momento do uso, para cada 180 ml do meio básico, adiciona-se assepticamente:

- 20 ml de albumina bovina 5%, esterilizada por filtração.
- 2 ml de solução de glicose 50%, autoclavar a 121°C por 15 minutos.

ANEXO 4.2.

Solução estoque a 0,08 M de disulfato de tri-potássio de fenolftaleína

2,6 g de disulfato de tri-potássio de fenolftaleína é dissolvida em 50 ml de água destilada e esterilizada por filtração.

ANEXO 5

Teste da hidrólise do Tween 80 (WAYNE 1962)

Uma alça de platina (3 mm de diâmetro) de uma cultura jovem crescida em meio de Löwenstein-Jensen é suspensa no substrato de Tween 80 (ANEXO 5.1.) e incubado a 37°C por 21 dias. São feitas leituras aos 5 e 21 dias de incubação. Uma amostra de M. kansasii é incluída como controle positivo e o controle negativo um tubo não inoculado com substrato de Tween 80. O teste positivo é indicado quando o substrato troca a cor ambar para vermelho-rosa.

Reagentes para o teste da hidrólise do Tween 80

- A - Solução de fosfato M/15, pH 7.0, preparada como no ANEXO 3.1.
- B - Tween 80.
- C - Solução a 0,1% de vermelho neutro.

Preparo do substrato

Solução de fosfato M/15.....	100	ml
Tween 80.....	0,5	ml
Solução de vermelho neutro.....	2,0	ml

Os ingredientes acima são misturados e distribuídos em quantidades de 2 a 4 ml em tubos de ensaio 10 x 125 mm esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Estes tubos podem ser estocados em refrigerador por um período não superior a duas semanas.

ANEXO 6

Meio de Middlebrook

Middlebrook 7 H 10 agar* (desidratado)...	3,8	g
Água destilada estéril.....	200	ml
Glicerina P.A. (neutra).....	1	ml
Bacto Middlebrook OADC enrichment*.....	20	ml

Acrescentar aos 201 ml de água destilada glicerina da fria 3,8 g de Middlebrook 7 H 10 agar, ferver até dissolver completamente e esterilizar 10 minutos a 121°C.

Deixar esfriar até 50-55°C e adicionar assepticamente 20 ml de Bacto Middlebrook OADC enrichment. Distribuir assepticamente em tubos de ensaio com tampa de rosca e inclinar.

* Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA

ANEXO 7

Salina tamponada fenicada

Solução concentrada

Cloreto de sódio.....	80 g
Na ₂ HPO ₄ (anidro).....	10 g
KH ₂ PO ₄ (anidro).....	4 g
Água destilada.....	1000 ml

Distribuir 30 ml da solução em frascos com capacidade de 300 ml e esterilizar 15 minutos a 121°C.

Antes de usar, acrescentar 1,5 ml de fenol líquido e completar o volume para 300 ml com água destilada.

ANEXO 8

Cultura de larvas (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950)

A - Cultura

Fezes de bovinos e serragem previamente esterilizados foram misturados até se formar uma mistura solta, promovendo um bom arejamento no seu interior. Os ovos obtidos de fêmeas adultas de Oesophagostomum radiatum foram adicionados à mistura acima, que foi umidecida sem permitir a formação de depósitos de água no fundo do vidro. Esta cultura foi incubada a 26 - 28°C por sete dias, sendo revisada diariamente e quando necessário umidecida.

B - Coleta de larvas

Para coleta de larvas, utilizou-se da técnica de Bauman modificada por ROBERTS & O'SULLIVAN (1950). No próprio vidro que contém a cultura (capacidade 200 ml, boca larga), derrama-se água morna a uma temperatura ligeiramente superior a temperatura do meio de cultura até encher o vidro completamente, formando um menisco na parte superior. Coloca-se sobre a boca do vidro de cultura uma placa de Petri invertida e novamente inverte-se o conjunto. No espaço compreendido entre o frasco com a cultura e os bordos da placa de Petri, derrama-se

um pouco de água morna até a altura de 0,5 cm. As larvas saem do vidro de cultura e passam para a água contida entre o vidro e os bordos da placa de Petri em aproximadamente duas horas. As larvas foram colhidas por meio de pipeta juntamente com toda a água contida na placa de Petri e colocado em um tubo de ensaio em temperatura de 6 a 8°C por duas horas para que as larvas se dimentem. Ao fim deste período o líquido do tubo é decantado com cuidado para que fique uma coluna de aproximadamente 1 cm do sedimento contendo as larvas.

ANEXO 9

Tuberculinização dos animais do experimento
(LANGENEGGER et alii 1981)

Foi executada tuberculinização comparada utilizando-se tuberculina PPD aviária e PPD bovina produzidas pela Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA, Rio de Janeiro, com uma concentração de 0,05 e 0,1 mg por dose, respectivamente. As tuberculinas foram aplicadas intradermicamente na região da omoplata, a primeira anterior e a segunda posteriormente à espinha acromiana, em locais previamente depilados com máquina manual de barbeiro, a cerca de 15 cm um do outro. Para aplicação das tuberculinas foram usadas seringas da marca McLINTOCK * que injeta dose automática de 0,1 ml. A medida da espessura da dobra da pele, antes da tuberculinização e 72 horas após, na leitura do teste, foi feita com cutímetro da marca HAUPTNER**, equipado com mola. A interpretação dos resultados, obedeceu ao seguinte esquema:

* ASTRA, C.J. Hewlett & Son Ltda., Watford, Hents, Inglaterra

** H. Hauptner, Solinger, Alemanha Ocidental.

Teste comparado	Diferença do A.E.D.P. (mm)	Resultado tuberculose
TB menor que TA	-	Negativo
TB maior que TA	0,0 a 0,9	Negativo
TB maior que TA	2,0 a 2,9	Suspeito
TB maior que TA	3,0 ou mais	Positivo

LEGENDA

TB - Tuberculina bovina

TA - Tuberculina aviária

A.E.D.P. - Aumento de espessura da dobra da pele

Animais que apesar de negativos à tuberculose apresentavam reações inespecíficas não entraram no experimento.