FLÁVIA CAROLINA SOUZA DE OLIVEIRA

Padronização do teste imunoalérgico e de reação imunoenzimática aplicados ao diagnóstico da tuberculose e micobacterioses em suínos (*Sus scrofa*) experimentalmente sensibilizados com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium* inativados.

São Paulo

2012

FLÁVIA CAROLINA SOUZA DE OLIVEIRA

Padronização do teste imunoalérgico e de reação imunoenzimática aplicados ao diagnóstico da tuberculose e micobacterioses em suínos (*Sus scrofa*) experimentalmente sensibilizados com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium* inativados.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

De acordo: _____

(Orientador)

São Paulo

2012

Obs.: A versão original se encontra disponível na biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2579
FMVZ

Oliveira, Flávia Carolina Souza de
Padronização do teste imunoalérgico e de reação imunoenzimática aplicados ao diagnóstico da tuberculose e micobacterioses em suínos (*Sus scrofa*) experimentalmente sensibilizados com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium* inativados / Flávia Carolina Souza de Oliveira. -- 2012.

107 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos.

1. Tuberculose. 2. Micobacteriose. 3. Suínos. 4. Teste de Elisa. 5. Teste de tuberculinização. 6. Padronização. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Diagnóstico da tuberculose em suínos (*Sus scrofa*) vivos experimentalmente sensibilizados com micobactérias inativadas. Emprego do teste imunoalérgico de tuberculina e da reação de Elisa de captura", protocolado sob o nº1697/2009, utilizando 80 (oitenta) suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09 de setembro de 2009.

We certify that the Research "Diagnosis of tuberculosis in pigs (*Sus scrofa*) living experimentally sensitized with inactivated mycobacteria. Employment test immunoalergic of tuberculin reaction and the capture of Elisa", utilizing 80 (eighty) swine, protocol number 1697/2009, under the responsibility Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 10 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Flávia Carolina Souza de

Título: Padronização do teste imunoalérgico e de reação imunoenzimática aplicados ao diagnóstico da tuberculose e micobacterioses em suínos (*Sus scrofa*) experimentalmente sensibilizados com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium* inativados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

DEDICATÓRIAS

**“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei se não fosse por elas, eu não
teria saído do lugar...”**

**“As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam
muito”**

(Chico Xavier)

Dedico a Deus, a Nossa Senhora, meus pais (Antonio e Rosalha), meu irmão (Marcus Vinicius), aos meus avôs (Solange e Rosalvo), a minha professora (Simone), a minha família por todo apoio, amor e dedicação em todos os momentos e ao meu grande amor Jordi que me fez seguir em frente e acreditar que às vezes as dificuldades nos fazem crescer.

A todos meus animais que sempre estiveram comigo e aqueles que sempre serão lembrados por toda eternidade. Sou-lhes muito grata!

In memoriam: meus cachorros: Miquey, Suzy; meu casal de hamster: Loly e Lily; meu porquinho: petruquio, coruja: Luiza e ao meu atual animal que tanto me faz feliz: Ming Duques dog.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“Quando nascemos, dão-nos o livro da vida, mas estas páginas estão em branco, e cabe a nós preenchê-las. Não é obrigatório seguir as indicações alheias.

Quando somos pequenos, os pais e a sociedade escrevem por nós os primeiros capítulos, e pode acontecer que não gostemos muito deles.

Mas nada nos obriga a continuar a história no estilo em que foi começada.

Por isso, viremos hoje uma nova página, agarremos a caneta e comecemos a escrever a nossa história. Afinal de contas, “só se vive uma vez”.

Lucien Auger

A **Deus**, por ter me dado a minha vida e saúde, por permitir preservá-la durante toda essa caminhada frente a tantos obstáculos que se puseram no meu caminho;

Ao Prof. Dr. **Sílvio Arruda Vasconcellos**, o senhor foi, nos momentos de mestre, o mais sincero amigo, e nos momentos de amigo, o mais leal dos mestres. “Obrigado pelos ensinamentos a mim dispensados com tanta dedicação”.

In memoriam: ao prof. Dr. **Edgar de Aquino Viegas** por ter sido um grande homem e que sem saber ajudou-me a concluir o mestrado e agora o doutorado também, por ter guardado os seus artigos, relíquias, que mais tarde poderiam servir de ajuda a outros estudantes o meu muito obrigado;

A Prof.^a Dra. **Sônia Regina Pinheiro** por todo carinho, dedicação, força, oração e principalmente pela força e encorajamento dispensado a minha pessoa desde a época do mestrado até o presente trabalho;

Aos Professores Dr. **José Antonio Jerez** e Dr. **Fumio H. Ito** por todo apoio e amizade;

Ao Prof. Dr. **Nilson Roberti Benites** pela amizade, orientação e pelas nossas conversas que tanto me aconselharam;

A Prof. Dra. **Eliana Roxo**, pelos conselhos, por colaborar com este trabalho fornecendo o paquímetro, artigos para a execução deste trabalho;

As Professoras **Anna Fernanda** e **Tatiana Maslowa** que me ensinaram o valor de uma amizade;

Ao Prof. Dr. **Walter Lilenbaum** e a Pós- Doc **Carla Marassi**, pelo apoio incondicional e pelos ensinamentos principalmente sobre o procedimento do teste de Elisa de Captura.

Ao Prof. Dr. **Paulo César Maiorka** pela ajuda e orientação na realização do exame histológico deste trabalho;

Ao Médico veterinário **Francisco Rafael Martins Soto**, pela concessão do local e dos animais para a realização do experimento sem os quais não seria possível a sua realização;

Ao Médico Veterinário **Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota** pela concessão dos sensibilizantes para o experimento;

A Prof. Dra. **Maria Emilia Bavia** que acreditou na minha capacidade, confiou e incentivou-me a fazer pós-graduação;

A Prof.^a **Simone de Aquino Viegas**, pelo estímulo, paciência, confiança e por ser uma das pessoas que me fizeram sentir orgulho de ter escolhido a profissão de Médico Veterinário. Obrigado por ter se tornado minha mentora. “Você realmente é uma pessoa primavera”;

Ao Prof. Dr. **Robsom Bahia Cerqueira** pelo incentivo, companheirismo e compreensão;

A Prof. Dra. **Cláudia Carvalho** e ao Prof. Dr. **José Cláudio** da Faculdade UNIME, pela ajuda na leitura das laminas e pelo ombro amigo;

Ao Prof. Dr. **Paulo Eduardo Brandão** pela ajuda e compreensão nos momentos difíceis;

Aos professores Doutores **Lúcio Leopoldo, João Vieira, Magnavita** e a Prof.^a **Maria Helena** pelo apoio;

Aos Professores da UNIME **Ana Rosa, Gabriela Covizi, Aline Quintela, Marcos Frões, Francisco Chico, Tatiane Sales, Adamas Bonfilio, Vivian, Marta Vasconcellos, Rodrigo Bitencourt, Fúlvia, Eliel** pela ajuda prestada, o meu muito obrigado;

Ao Prof. Dr. **Roberto Badaró** da Universidade Federal da Bahia UFBA, por ter salvado a minha vida, sem ele com certeza essa obra não teria sido iniciada muito menos concluída, não só a minha pessoa mais toda a minha família e aqueles que nutrem algum carinho e simpatia por mim, agradecemos a esse homem que Deus colocou no meu caminho para me ajudar a seguir em frente na minha jornada e continuar a preencher as páginas do meu livro, o meu eterno e sincero muito obrigado;

A **Zenáide Maria de Moraes** que me tratou como uma filha se preocupando sempre com a minha saúde, por não ter me deixado desistir, pelos ensinamentos e pela grande amizade. Uma profissional competente que tem uma enorme dedicação pelo que faz;

A **Gisele Oliveira de Souza** pela paciência, por ter me emprestado seu ombro amigo as diversas horas de tristeza e por suas palavras de fé;

A Universidade de São Paulo, a **FMVZ** e em especial ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, na figura de seus docentes e funcionários, pelos ensinamentos e experiências vitais, para a boa formação do profissional e pessoa;

Ao Prof. Dr. **Sérgio Santos de Azevedo** por ter me ajudado na parte estatística deste trabalho e por ter se tornado um verdadeiro amigo;

A **Carolina de Souza Américo Batista** por ter me ajudado em diferentes momentos dessa caminhada, por ter se tornado uma amiga irmã, durante todo esse meu percurso esteve ao meu lado oferecendo-me palavras de incentivo e não deixando nunca que eu desisti-se dos meus sonhos;

Agradeço a **Cidele de Paula Coelho** que acabou se tornando uma irmã neste curto intervalo de tempo, dando-me forças, incentivos para sempre seguir em frente e às vezes até dividindo sua linda família e amigos comigo nos meus momentos mais carentes dessa caminhada;

A amiga **Adriana Pinheiro da Franca** por ter me apoiado em todos os momentos sem reclamar da minha falta de paciência, por pegar na minha mão e rezar junto comigo em vários momentos difíceis;

Aos trabalhadores da granja de suínos: **Lindioberto Rodrigues Duarte** (Totó) e a **João Paulo** por estar sempre presente na parte experimental, ajudando em tudo que foi possível;

Aos **suínos**, que participaram ativamente deste trabalho contribuindo assim para o avanço no estudo da epidemiologia da tuberculose e micobacteriose;

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPQ**), pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo nº 143127/2009-8);

A todos os amigos da pós-graduação que passaram por todos os momentos de angústia, luta perseverança e companheirismo:

Aos pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Zoonoses Bacterianas: Amane, Kacia, viviane e Léia.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, em especial a Virgínia, Danival, Carol, Sandra, Antonio, Pedrinho, Rosana, Jucelia, Tânia e Cristina.

A toda equipe da biblioteca da FMVZ-USP, por toda ajuda prestada em especial a Elza e pela sua atenção dispensada a min. Às secretarias da pós – graduação da FMVZ – USP: Dayse, Claudia e Joana.

OBRIGADA!

RESUMO

RESUMO

OLIVEIRA, F. C. S. Padronização do teste imunoalérgico e de reação imunoenzimática aplicados ao diagnóstico da tuberculose e micobacterioses em suínos (*Sus scrofa*) experimentalmente sensibilizados com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium* inativados. [Standardization of the immunoallergic skin test and immunoenzymatic assay test applied for the diagnosis of tuberculosis and mycobacterioses in swine (*Sus scrofa*) experimentally sensitized with oily suspensions of inactivated *M. bovis* or *M. avium*]. 2012. 107p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Foi investigado o valor diagnóstico da resposta alérgica cutânea à tuberculina e do ELISA indireto, com antígeno recombinante MPB 70, em leitões experimentalmente sensibilizados, pela via intramuscular, com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium* inativados. Foram utilizados 91 animais divididos em quatro grupos. Os grupos A e B, cada um com 25 indivíduos, grupos C e D com 21 e 20 indivíduos respectivamente, balanceando-se as características de raça, linhagem, faixa etária e sexo. Aos 21 dias de idade, todos os animais foram submetidos a uma triagem com a aplicação de tuberculina PPD de *M. bovis*, pela via intradérmica na base da orelha e não houve qualquer tipo de reação. Decorridos 60 dias do teste tuberculínico de triagem, o grupo A, recebeu injeção intramuscular de 0,5 mL de uma suspensão oleosa de *M. avium* estirpe D4; o grupo B, recebeu 0,5 mL de uma suspensão oleosa de *M. bovis* estirpe AN5; o grupo C (controle I), recebeu 0,5 mL do adjuvante oleoso e o grupo D (controle II), recebeu 0,5 mL de solução fisiológica. Foi realizado o exame histopatológico de biópsias das reações cutâneas e a colheita de sangue para o teste de ELISA de captura. Após 30 dias da sensibilização, foi efetuada a prova de tuberculinização comparativa com reação medida pela variação da espessura da pele com paquímetro às 0h, 24h, 48h e 72h, após a aplicação das tuberculinas. No teste comparativo, lido às 72 horas, a reação foi considerada negativa quando a diferença das reações entre o PPD bovino e o PPD aviário foi menor que 6,7 mm; suspeito ou inconclusivo quando a diferença se situou na faixa de 6,7 a 7,5 mm; e positiva para o tipo de PPD, considerando-se tuberculose para PPD *M. bovis* e micobacteriose para PPD *M. avium*, quando a diferença da reação foi superior a 7,5 mm. Nos exames histopatológicos, foi observado intenso infiltrado inflamatório linfocitário no local das reações intradérmicas dos animais testados com o PPD homologado ao tipo de micobactéria utilizada na suspensão oleosa sensibilizante. O ensaio de ELISA com antígeno, MPB 70 recombinante, foi capaz de revelar a presença de anticorpos contra o *M. bovis*, porém não revelou anticorpos para *M. avium*.

Palavras-chave: Tuberculose. Micobacteriose. Suínos. Teste de Elisa. Teste de tuberculinização. Padronização.

ABSTRACT

ABSTRACT

OLIVEIRA, F. C. S. **Standardization of the immunoallergic skin test and immunoenzymatic assay test applied for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteriosis in swine (*Sus scrofa*) experimentally sensitized with oily suspensions of inactivated *M. bovis* or *M. avium*.** [Padronização do teste imunoalérgico e de reação imunoenzimática aplicados ao diagnóstico da tuberculose e micobacterioses em suínos (*Sus scrofa*) experimentalmente sensibilizados com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium* inativados]. 2012. 107p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The diagnostic value of the cutaneous allergic response to tuberculin and Indirect ELISA test was investigated using MPB 70 recombinant antigen, in piglets experimentally sensitized intramuscularly with the oily suspensions of inactivated *M. bovis* or *M. avium*. The ninety-one animals used were divided into four groups. The groups A and B were formed each with 25 individuals, and groups C and D, with 21 and 20 individuals, respectively, balancing the characteristics of race, ancestry, age and sex. At the age of 21 days, all the animals were submitted to the screening test with the use of *M. bovis* PPD, by the intradermal route at the base of the ear and no reaction was detected. Sixty days after the screening tuberculin test, animals of the group A were injected intramuscularly with 0.5 mL of oily suspension of *M. avium* D4 strain; animals of group B received 0.5 mL of an oily suspension of *M. bovis*, AN5 strain; and the members of group C (control I) received 0.5 mL of an oily adjuvant and the individuals of group D (control II) received 0.5 mL of saline solution. Histological examinations of biopsies of skin reactions were carried out and blood collections made for capture ELISA. Following 30 days of sensitization, comparative skin reactions were measured by the variation in skin thickness with a caliper at 0h, 24h, 48h and 72h after applications of tuberculins. In the comparative test measured at 72h, the reaction was considered negative when the difference of the reactions between bovine PPD and avian PPD was less than 6.7 mm; suspected or inconclusive, when the difference stood in the range of 6.7 to 7.5 mm; and positive according to the type of PPD, considering tuberculosis the *M. bovis* PPD and mycobacteriosis the *M. avium* PPD, when the difference of the reaction was greater than 7.5 mm. In histopathological examinations, intense lymphocytic inflammatory infiltrate were observed at the site of intradermal reactions of the animals tested with PPD homologous to the type of mycobacteria used in sensitizing oil suspension. The ELISA assay with MPB 70 recombinant antigen was able to reveal the presence of antibodies against *M. bovis*, but did not reveal antibodies to *M. avium*.

Keywords: Tuberculosis. Mycobacteriosis. Pigs. ELISA test. Tuberculin test. Standardization

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores médios gerais dos aumentos de espessura da pele (mm) dos suínos, obtidos das medidas de todos os momentos das leituras, induzidos pelos PPD B (bovino) e PPD A (aviário), aplicados na região dorsal da orelha, segundo os grupos experimentais de suínos 70
- Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão (mm) dos aumentos de espessura da pele de suínos, induzidos pelo PPD aviário, aplicado na região dorsal da orelha, segundo os grupos experimentais e os momentos de leitura 71
- Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão (mm) dos aumentos de espessura da pele de suínos com PPD bovino, aplicado na região dorsal da orelha, segundo os grupos experimentais e os momentos da leitura dos 74

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1- Espessura da pele (mm), dorsal da orelha de suínos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão oleosa de *Mycobacterium avium*, segundo o grupo, o número de identificação do animal, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária 62
- Quadro 2 – Espessura da pele (mm), dorsal da orelha de suínos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão oleosa de *Mycobacterium bovis*, segundo o grupo, o número de identificação do animal, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária 64
- Quadro 3 – Espessura da pele (mm), na região dorsal da orelha, de suínos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão de adjuvante, segundo o grupo, o número de identificação, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária 66
- Quadro 4 – Espessura da pele (mm), na região dorsal da orelha, de suínos sensibilizados experimentalmente com solução fisiológica (0,9% NaCl), segundo o grupo, o número de identificação, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária 68
- Quadro 5 – Valor da densidade óptica (D.O.) para o teste de ELISA em suínos sensibilizados experimentalmente com suspensões de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, adjuvante oleoso e solução fisiológica, segundo o grupo, o número de identificação do animal, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina aviária e bovina..... 82

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Médias aritméticas da espessura da pele, expressas em milímetros (mm), de suínos sensibilizados com suspensão oleosa de *M. avium* segundo o tipo de tuberculina empregada e o momento da leitura do teste comparativo..... 63
- Gráfico 2 – Médias aritméticas da espessura da pele, expressas em milímetros (mm), de suínos sensibilizados com suspensão oleosa de *M. bovis*, segundo o tipo de tuberculina empregada e o momento da leitura do teste comparativo 65
- Gráfico 3 – Médias aritméticas da espessura da pele, expressas em milímetros (mm), de suínos sensibilizados com suspensão de adjuvante oleosa segundo, o tipo de reativo e o momento da leitura do teste comparativo 67
- Gráfico 4 – Médias aritméticas da espessura da pele, expressas em milímetros (mm), de suínos sensibilizados com solução fisiológica segundo o tipo de reativo e o momento da leitura do teste comparativo 69
- Gráfico 5 – Valores médios da espessura da pele de suínos, expressos em milímetros, no local da aplicação do PPD aviário, segundo os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizados com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis*, Grupo C – sensibilizado com adjuvante e Grupo D (controle) e o momento da leitura do teste comparativo 71
- Gráfico 6 – Valores médios da espessura da pele de suínos expressos em milímetros, no local da aplicação do PPD bovino, segundo os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizados com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis*, Grupo C – sensibilizado com adjuvante e Grupo D (controle) e o momento da leitura do resultado do teste comparativo 72
- Gráfico 7 – Intervalo de confiança da variação da espessura da pele, expressa em milímetros (mm), no ponto de aplicação da tuberculina PPD bovina segundo o grupo

experimental: grupo D (reações inespecíficas), grupo A (reações heterólogas) e grupo B (reações homólogas)	75
Gráfico 8 – Intervalo de confiança da variação da espessura da pele, expressa em milímetros (mm), no ponto de aplicação da tuberculina PPD aviário segundo o grupo experimental: grupo D (reações inespecíficas), grupo A (reações homóloga) e grupo B (reações heteróloga).....	76
Gráfico 9 – Intervalo de confiança da espessura da pele, expressa em milímetros (mm), segundo o grupo (A, B e D) e o tipo de reativo (tuberculina aviária / tuberculina bovina), em relação às diferenças (espessura da pele da tuberculina bovis menos aviária)	76
Gráfico 10– Valores médios da diferença entre a espessura da pele de suínos, medidas nos locais da reação ao PPD bovino e aviário, em milímetros, segundo os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizados com <i>M. avium</i> ; Grupo B – sensibilizado com <i>M. bovis</i> , Grupo C – sensibilizado com adjuvante e Grupo D (controle) e o momento da leitura do resultado do teste comparativo	77
Gráfico 11 - Avaliação da resposta humoral dos suínos do grupo A, sensibilizados com <i>M. avium</i> , pela técnica do ELISA indireto, segundo o momento experimental	84
Gráfico 12 - Avaliação da resposta humoral dos suínos do grupo B, sensibilizados com <i>M. bovis</i> pela técnica do ELISA indireta, segundo o momento experimental	84
Gráfico 13 - Avaliação da resposta humoral dos suínos do grupo C, inoculados com adjuvante oleoso, pela da técnica do ELISA indireto, segundo o momento experimental	85
Gráfico 14 - Avaliação da resposta humoral dos suínos do grupo D, inoculados com solução salina, em diferentes períodos através da técnica do ELISA indireto, segundo o momento experimental	85
Gráfico 15 - Médias de densidade óptica no teste de ELISA indireto com antígeno MPB 70, segundo o grupo experimental e o momento da colheita do sangue, etapa experimental	86

Gráfico 16 – Intervalos de confiança no teste de ELISA indireto com antígeno MPB 70, segundo o grupo experimental, o momento da colheita do sangue e a etapa experimental	87
---	----

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Animais com 21 dias de vida foram mantidos em celas parideiras individuais e micro ambiente com aquecimento e aleitamento materno	52
Figura 2 – Setor de creche em baias coletivas de alvenaria	52
Figura 3- Mensuração da pele da orelha do animal, antes da aplicação da PPD bovino (A) na orelha esquerda e da aplicação da PPD aviária (B) na orelha direita para realização do teste comparativo e suas respectivas reações logo após a aplicação das PPDs (C e D).	55
Figura 4 - Reação inflamatória após a aplicação do PPD aviária após 72 horas.....	73
Figura 5 - Reação inflamatória após a aplicação do PPD bovino após 72 horas	73
Figura 6 - Corte histológico da região dorsal da orelha dos suínos (A) do grupo controle que não foram sensibilizados nem desafiados (Grupo E), e (B) representa (Grupo D) que receberam inoculação de solução fisiológica e foi desafiado com as PPD, observou-se ausência de alteração histopatológica dignas de nota. HE (40x).....	78
Figura 7 – Corte histológico da orelha de suínos que foram sensibilizados com adjuvante (óleo mineral) e desafiados com tuberculinas e colhidos após 72 horas. (A) Animais desafiados com PPD aviário, (B) Animais desafiados com PPD bovino, apresentaram presença de discreto infiltrado inflamatório linfocítico predominantemente na região subepidérmica. HE (200x).....	79
Figura 8 - Corte histológico da área de aplicação do PPD aviário, na região dorsal da orelha de suíno do grupo A que foram sensibilizados com o PPD aviário (A), aplicação do PPD bovino, na região dorsal da orelha de suíno do grupo B que foram sensibilizados com o PPD bovino (B), colhido às 72 horas após leitura. Houve presença de intenso infiltrado inflamatório em vários pontos concentrados no grupo B, HE (200x).....	80
Figura 9 - Corte histológico da região dorsal da orelha de suíno 72 horas após desafio com PPD bovino. Imagens representativas de (A) animais sensibilizados com M. bovis (grupo A –	

reação específica); (B) animais sensibilizados com *M. avium* (B – reação para-específica). Presença de intenso infiltrado linfocítico e separação das fibras devido ao edema na derme foram às alterações histopatológicas encontradas. HE (200x) 81

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D. O	Densidade óptica
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
g	grama
hs	horas
µg	micrograma
mg	miligrama
µL	microlitro
mL	mililitro
<i>M. avium</i>	<i>Micobacterium avium</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Micobacterium bovis</i>
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
PNSS	Programa Nacional de Sanidade Suídea.
PPD	Derivado proteico purificado
TC	Teste Comparativo
TCC	Teste Cervical Comparativo

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	35
2 JUSTIFICATIVA	47
3 OBJETIVO	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 ANIMAIS	51
4.2 EXAMES FÍSICOS	53
4.3 SENSIBILIZANTES	53
4.4 SENSIBILIZAÇÃO	53
4.5 TUBERCULINIZAÇÃO	54
4.6 AMOSTRAS DE PELE	55
4.7 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	56
4.8 ELISA	56
4.8.1 Amostras de sangue	56
4.8.2 Elisa indireto com antígeno mpb 70	57
5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS	59
6 RESULTADOS	61
6.1 TESTES IMUNOALÉRGICO CUTÂNEO	61
6.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	78
6.3 ELISA	81
7 DISCUSSÃO	89
8 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	96
ANEXO	107

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A importância da suinocultura brasileira assenta-se no grande contingente de produtores envolvidos, no volume de empregos diretos e indiretos que propicia, bem como, na produção de proteínas de alta qualidade, em reduzido espaço físico e em curto espaço de tempo (ASSIS; MURATORI, 2007).

Em 2010 a produção de suínos brasileira cresceu 1,5 % em relação a 2009, passando de 3,19 para 3,24 milhões de toneladas de carne. Esse crescimento foi sustentado pelo aumento de 3,5% no peso médio dos animais abatidos. Em cabeças, a oferta para abate manteve-se estável com cerca de 34 milhões de cabeças, valor superado apenas pelos Estados Unidos da América, União Européia e pela China, esta última detentora do maior rebanho de suínos do mundo com mais de 460 milhões de animais (GONÇALVES; PALMEIRA, 2011; APCS, 2011).

Em setembro de 2011 o Brasil exportou 41.393 toneladas de carne suína o que representou uma redução de 18,86% em comparação às 51.012 toneladas do mesmo mês do ano de 2010. Em termos de receita cambial, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria Produtiva e Exportadora de carne suína houve uma queda de 8,05% no período, de US\$ 123. 705 milhões para US\$ 113. 741 milhões (IBGE, 2010).

No primeiro semestre de 2011 os principais mercados da carne suína brasileira foram: Rússia, Hong Kong, Angola, Argentina, Cingapura, Albânia, Uruguai e Armênia (ABIEPCS, 2011; SILVEIRA, 2011).

O Brasil, quarto maior produtor de suínos do mundo exporta a carne desses animais para nada menos que 76 países. Contudo em 2010 enquanto na Áustria, Espanha e Paraguai, os consumos de carne suína por habitante foram respectivamente de 73,1 Kg; 66 Kg e 26 Kg, no Brasil o valor atingido foi de apenas 15 kg (ROCHA, 2011).

Na metade do século XX, a carcaça dos suínos apresentava de 40% a 45% de carne magra e espessuras de toucinho de cinco a seis centímetros. Hoje, além da maior quantidade de carne magra, a espessura de toucinho não ultrapassa a um centímetro. De fato, na atualidade o suíno “light” tem 31% menos de gordura que as outras linhagens, 14% menos calorias e a taxa de colesterol é 10% inferior ao observado há 30 anos (SILVEIRA, 2011).

Na região Sudeste do Brasil, predomina o suinocultor independente, que em 2006 produziu 17,6% da carne suína comercializada no País, já na região Centro Oeste, em

continua expansão, predomina o suinocultor integrado que tem assumido 14,5% da produção nacional (MORÉS et al., 2006).

A maior parte da população suína do Brasil está no Sul (56 %) e o Estado de Santa Catarina é o principal produtor (23,90%), seguido do Rio Grande do Sul (17,86%) e Paraná (14,33%). Duzentas mil toneladas de carne suína são produzidas anualmente no Estado de São Paulo que hoje ocupa a quinta colocação na suinocultura nacional com (4,85%) da produção brasileira (IBGE, 2007).

Nos últimos anos, o intenso crescimento da suinocultura nacional transformou suinocultores brasileiros em empresários rurais e independentemente do tamanho da criação, os desafios e dificuldades têm forjado profissionais capacitados para o gerenciamento das granjas de produção. Neste contexto a tecnologia, a qualidade e a segurança alimentar fazem parte dessa realidade. Por isso, a carne suína reconhecida internacionalmente como segura, excelente para o consumo interno e para a exportação, vem ocupando, privilegiadas fatias do mercado mundial (GONÇALVES; PALMEIRA, 2011).

Dentre as zoonoses que acometem os suínos, a tuberculose e as micobacterioses são doenças infecciosas crônicas, cosmopolitas. A etiologia de tais processos envolve, respectivamente, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e as micobactérias não tuberculosas – (*mycobacteria other than tuberculosis* – MOTT) - (THOEN, 1988; JUBB; KENNEDY, 1993).

O grupo das micobactérias apresenta poucos patógenos obrigatórios e um grande número de saprófitos, que tem como habitat diversos componentes ambientais: solo, água, poeira e aerossóis. Estes agentes, usualmente saprófitas podem, em determinadas circunstâncias, provocar doenças oportunistas no homem e nos animais (WOLINSKY, 1979; GRANGE; YATES, 1994).

As doenças provocadas por micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* em animais e seres humanos são conhecidas como micobacterioses. Os agentes etiológicos das micobacterioses têm recebido diversas denominações: “micobactérias atípicas”, “*mycobacteria other than tuberculosis* – MOTT”, “micobactérias não tuberculosas”, “saprófitas”, “oportunistas”, “não patogênicas”, “ambientais” e ainda “micobactérias patogênicas ambientais” (SATO et al., 1990; KONEMAN et al., 2001). Estes microrganismos têm sido incluídos em diversos complexos: *M. avium* (*M. intracellulare*, *M. avium* subespécie *avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis* e *M. avium* subespécie *sylvaticum*), MAIS (*M. scrofulaceum*, *M. avium* e *M. intracellulare*), e *M. terrae* (*M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale*), saliente-se,

contudo que essas denominações e agrupamentos ainda são discutidos pelos taxonomistas (VASCONCELLOS, 1979; PRITCHARD, 1988; KANTOR, 1994; KRIEG; HOLT, 1994; HAAGSMA, 1998; FALKINHAM III, 1996; ROXO et al., 1998; PEDLEY et al., 2004).

As micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC), são bacilos de crescimento lento produtores de pigmento amarelo na ausência de luz. O MAC é constituído por duas espécies, *M. avium* e *M. intracellulare*, classificadas sorologicamente em 28 sorovares. As micobactérias pertencentes aos sorovares 1 a 6; 8 a 11 e 21 representam o *M. avium*, as pertencentes aos sorovares 7, 12 a 20 e 25 representam o *M. intracellulare* (SATO et al., 1990).

Acredita-se que os microrganismos pertencentes ao MAC sejam ubiqüitários, pois são freqüentemente isolados, em todo o mundo, da água, das plantas e do solo (FALKINHAM III, 1996).

O freqüente encontro do MAC na água e solo é coerente com o papel destes microrganismos como patógenos oportunistas adquiridos do meio ambiente confirmando a suposição de que a infecção de seres humanos ocorra pelos tratos respiratórios e gastrointestinais (INDERLIED, 1997).

Os microrganismos pertencentes ao MAC têm assumido uma grande importância para a suinocultura moderna. De fato nos países onde a tuberculose bovina tem sido erradicada e o controle da tuberculose humana é bem-sucedido, há um crescente registro da micobacteriose suína provocada por estirpes do complexo MAC (YACHIDA; SHIMIZU, 1973).

As micobactérias apresentam elevada capacidade de sobrevivência às mais variadas condições ambientais. Wang et al. (2005) afirmaram que a presença de alta concentração de lipídeos na membrana externa aumenta a resistência destes microrganismos aos desinfetantes químicos. Os valores fornecidos pelo World Health Organization (1984) referiram que micobactérias sobrevivem por períodos de até dois anos em instalações contaminadas e por um ano, na água e no esterco. Blood e Henderson (1983) citaram o isolamento destes microrganismos nas fezes de bovinos, mantidas em condições ambientais, por períodos de até oito semanas. Williams e Hoy (1930) isolaram o bacilo da tuberculose bovina, em estrume animal armazenado por quatro meses.

O *Mycobacterium avium* incluído no grupo III de Runyon (não-fotocromógenas) tem sido utilizado como indicador de respostas heterólogas no diagnóstico da tuberculose bovina, contudo pode ser responsável por graves infecções em aves domésticas, silvestres e suínos (THOREL et al., 1997; KONEMAN et al., 2001; ACHA; SZYFRES, 2003).

As espécies de micobactérias causadoras da tuberculose – são *M. tuberculosis* (bacilo da tuberculose humano), *M. bovis* (bacilo da tuberculose bovina) e *M. avium* (bacilo da tuberculose aviária). Estes microrganismos apresentam características culturais e de patogenicidade distintas e os patógenos de mamíferos são mais relacionados entre si, do que o das aves (THOEN, 1988).

O *M. bovis* possui uma ampla gama de hospedeiros vertebrados incluindo animais domésticos e silvestres, e também pode provocar a tuberculose em seres humanos cuja ocorrência é denominada de tuberculose zoonótica (BRASIL, 2011).

O *M. tuberculosis*, principal agente etiológico da tuberculose dos seres humanos, também pode infectar bovinos, nos quais usualmente não causa doença progressiva, porém pode interferir nos resultados dos testes tuberculínicos (SONGER; BICKNELL; THOEN, 1980; BRASIL, 2006).

O *M. avium*, agente etiológico da tuberculose de várias espécies de aves, incluído no complexo MAIS (*M. avium*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*), também pode causar lesões granulomatosas nos linfonodos do trato gastrointestinal de suínos, e ocasionar sérias perdas econômicas no abate desses animais, pois as carcaças afetadas são depreciadas (BRASIL, 2004).

Dentre as espécies domésticas suscetíveis à infecção por bactérias do gênero *Mycobacterium*, os suínos podem ser infectados por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, vários sorotipos do complexo MAIS, e ainda por outras micobactérias (THOEN; KARLSON, 1986). Está condição situa o suíno como uma importante espécie “sentinela”, reveladora da presença de microrganismos causadores da tuberculose e de micobacterioses em uma determinada região (ACHA; SZYFRES, 2001).

A infecção de suínos por *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium* geralmente é consequência da inadequação do manejo, particularmente quando esses animais são alimentados com, restos de restaurantes, sanatórios, hospitais, laticínios e de matadouros ou quando é empregada a cama de serragem contaminada para forrar as instalações (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE LA SALUD, 1970; CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Em relação ao *M. bovis*, a principal fonte de infecção para suínos são os bovinos que eliminam a bactéria no leite e os suínos se infectam pela via digestiva, ao serem alimentados com subprodutos de laticínios (ACHA; SZYFRES, 2003).

Atualmente a tecnificação da suinocultura fez com que a ocorrência da tuberculose em suínos por *M. tuberculosis* passasse a ser muito rara, pois, o hábito de alimentar suínos com restos de alimentos humanos foi abandonado, contudo a infecção por *M. bovis* e micobactérias

oportunistas ou ambientais persiste e tem sido associada, respectivamente, ao uso de soro de leite e a partidas de cama de maravalha contaminadas (ALFREDSEN; SKJERVE, 1993; MORÉS et al., 2006).

O soro de leite, subproduto dos laticínios, pode ser usado na forma integral, (animais nas fases de crescimento, terminação e porcas em gestação) ou na forma condensada (suínos em crescimento e terminação) e ainda na forma desidratada como soro de leite em pó (leitões ao desmame) (HAUPTLI et al., 2005).

No caso das micobacterioses de suínos tem sido observado que com a remoção da via de transmissão, usualmente cama de maravalha contaminada, a sensibilização dos animais desaparece, contudo, ainda não existe um instrumento diagnóstico eficiente que permita o monitoramento e a vigilância sanitária nos rebanhos de modo a orientar a introdução de alterações no manejo antes que os animais sejam encaminhados para o abate (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Nos suínos, a principal porta de entrada de microrganismos do gênero *Mycobacterium* é a mucosa do trato digestivo (93,7%) (JANETSCHKE, 1963). Portanto a alimentação contaminada é o veículo mais importante para o estabelecimento da infecção. Depois de ingeridas, as micobactérias penetram na mucosa do trato digestivo, instalam-se primariamente nas amígdalas e são drenadas para os linfonodos regionais (faríngeos, maxilares e cervicais), onde podem provocar lesões ou podem atingir a mucosa intestinal e os linfonodos mesentéricos. A evolução das lesões depende da habilidade da bactéria sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos. Após o contágio, os suínos eliminam o agente nas fezes, usualmente, entre 35 a 42 dias da infecção, contaminando o meio ambiente e seus componentes, sendo que a quantidade de bacilos eliminados e o período de excreção dependem da virulência e da dose da estirpe de micobactérias infectantes. As lesões encontradas em suínos infectados por micobactérias do complexo MAIS, estão usualmente localizadas nos linfonodos cefálicos e mesentéricos. Macroscopicamente tais lesões são caracterizadas por pequenos nódulos amarelados, caseosos, de tamanho variável, porém, eventualmente todo o gânglio pode estar comprometido (VASCONCELLOS, 1979; SOBESTIANSKY et al., 2001).

As lesões observadas nos linfonodos de suínos infectados por micobactérias do complexo MAIS são do tipo granulomatosas (BALIAN et al., 1997), mas não são conclusivas, uma vez que também podem ser provocadas por outras bactérias, como *Mycobacterium bovis* e *Rhodococcus equi* (THOEN; KARLSON, 1986; THOEN, 1992; SILVA et al., 2001).

A linfadenite observada nos suínos, causada por micobactérias do complexo MAIS é uma doença de evolução crônica, levando até quatro meses para o aparecimento das lesões macroscópicas, não altera o desempenho dos animais, mas é de importância econômica, pois, as carcaças afetadas são condenadas ou submetidas a destino condicionado (MARTINS, 2001).

Microscopicamente, as alterações teciduais observadas em suínos infectados pelo *M. tuberculosis* são caracterizadas por proliferação difusa de células epitelióides e de células gigantes. Macroscopicamente necrose e calcificação podem ser vistas notadamente em lesões antigas. Os linfonodos apresentam-se aumentados de tamanho e de consistência firme. Nas lesões provocadas pelo *M. avium*, a proliferação dos elementos do tecido conjuntivo acompanha o processo, com pouca tendência para a formação de uma parede bem definida (THOEN; KARLSON, 1986; SILVA et al., 2001). As lesões causadas por essas e demais micobactérias não são diferenciáveis por exames macro e microscópico (RAY et al., 1972), enquanto que a reação à tuberculina pode ocorrer já aos 28 dias da infecção com a MAC (MUSCOPLAT; THOEN; CHEN, 1975; THOEN, 1992).

No Brasil, as investigações realizadas com isolamento e tipificação de micobactérias em suínos têm constatado a presença de diversas espécies de microrganismos. No Estado do Paraná foi efetuado o isolamento e a identificação de *M. intracellulare* como agente etiológico de lesões tuberculóides de linfonodos cervicais de suínos de abate (LANGENEGGER; MENKE; LANGENEGGER, 1973). No Estado de Pernambuco no exame de 122 animais houve o isolamento de 45 culturas de micobactérias de 43 lesões das quais nove *Mycobacterium tuberculosis*, sete de *M. bovis*, 14 de *M. intracellulare*, seis de *M. scrofulaceum*, três de *M. terrae* e uma amostra de *M. gordonae*, *M. triviale* e *M. fortuitum*, três culturas não foram identificadas (LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1974).

Na Região de Brasília foram isoladas apenas micobactérias do grupo IV de Runyon (LANGENEGGER et al., 1975; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1981). Em Minas Gerais, de 63 culturas de micobactérias isoladas de suínos, uma foi de *Mycobacterium bovis*, 58 do complexo *M. avium – intracellulare – scrofulaceum* e quatro de *M. gordonae* (MOTA et al., 1980). No Estado de São Paulo, no período de 1993 – 1994 foram encontradas micobactérias do complexo MAC em linfonodos, tecido hepático e muscular de suínos de abate (BALIAN et al., 1997).

A linfadenite em suínos causada por micobactérias atípicas tem sido diagnosticada em muitos países do mundo, incluindo o Brasil, envolvendo sistemas modernos de produção de

suínos. Sua importância tem aumentado nos últimos anos, devido ao aumento da presença de lesões constatadas nos abatedouros pelo serviço de inspeção de carnes. No Sul do Brasil, as condenações por linfadenite apresentaram picos de ocorrência nos períodos de junho a outubro ($p=0,034$) e também com uma variação cíclica com picos a cada dois anos. Embora a infecção não comprometa o desempenho dos animais, ocasiona prejuízos tanto para o produtor quanto para a indústria (MORÉS et al., 2007).

Na região do sul do Brasil nos anos de 1997 a 1999, a frequência de linfadenite granulomatosa em suínos abatidos em frigoríficos com inspeção federal foi de 0,75% a 0,83%. Apesar dos valores apresentados serem aparentemente pequenos o impacto econômico para o setor produtivo foi muito elevado com valores de 1,4 a 1,8 milhões de reais em 1997; de 4,0 a 5,0 milhões de reais em 1998 e de 5,8 a 8,0 milhões de reais em 1999. Cada 0,1% de incremento na prevalência das condenações por linfadenite representou um prejuízo médio de R\$ 201 mil reais em 1997, R\$ 531 mil reais em 1998 e R\$ 834 mil reais em 1999 (MORÉS et al., 2007).

Nos Estados Unidos da América os prejuízos anuais decorrentes das micobacterioses em suínos são da ordem de U\$ 5,1 a 6,3 milhões. As perdas econômicas de uma carcaça afetada variam em função do destino indicado e dos recursos existentes no abatedouro. A maior parte das carcaças condenadas é destinada ao tratamento térmico (MORÉS et al., 2007).

Em rebanhos de suínos, o diagnóstico presuntivo da infecção por micobactérias *in vivo* é efetuado pelo teste de tuberculina, aplicada na região dorsal da orelha e pelo isolamento do agente em meio de cultura (THOEN, 1992).

A tuberculina é o extrato de cultivos do *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. avium* utilizados nos testes tuberculínicos (TIZARD, 2000). Este teste tem sido utilizado há mais de cem anos para o diagnóstico da tuberculose em bovinos (MONAGHAN et al., 1994). É uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (tipo IV), desencadeada por uma injeção intradérmica de tuberculina em animal sensibilizado pela infecção por micobactérias (TIZARD, 2000).

No local da injeção intradérmica de tuberculina, os animais infectados por micobactérias apresentam uma reação caracterizada por eritema e edema de consistência firme que não ocorre nos animais sadios. O processo inflamatório local atinge a sua maior intensidade entre 48 a 72 horas da aplicação do reativo. (MONAGHAN et al., 1994; TIZARD, 2000).

Morés et al. (2006) compararam métodos de tuberculinização aplicados ao diagnóstico da infecção por agentes do “complexo *Mycobacterium avium*” e *Mycobacterium bovis* em suínos comerciais com histórico de lesões de linfadenite granulomatosa no abate. Trabalharam com leitões experimentalmente infectados, pelas vias oral e intranasal, com estirpes patogênicas, respectivamente, de *M. avium* e *M. bovis*. Após a leitura dos testes imunoalérgicos, os animais foram abatidos e os resultados do teste cutâneo foram comparados com o das provas de isolamento, histopatologia e imunoperoxidase. Concluíram que as reações alérgicas superiores a 0,5 cm no diâmetro maior ou 0,2 cm no aumento da espessura da dobra da pele deveriam ser consideradas como positivas em termos da média das reações obtidas em dado rebanho, não se prestando, contudo, para o diagnóstico individual de casos isolados.

O teste de tuberculina pareado, com PPD aviário e bovino, é um bom auxílio diagnóstico para identificar rebanhos infectados por micobactérias, permitindo a discriminação de rebanhos infectados com MAC ou *M. bovis*. (REIS, 1965; SILVA et al., 2000; MORÉS et al., 2006; MORÉS, 2010a).

No Brasil, para uma granja de reprodutores de suínos ser classificada como Granja de Suínos Certificados (GSC), a Legislação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, na Instrução Normativa nº 12 de 23 de junho de 1999, estabelece que a granja deva realizar, periodicamente, exames laboratoriais e provas diagnósticas para a peste suína clássica, doença de Aujeszky, brucelose, tuberculose, leptospirose e sarna, bem como, para outras doenças, a critério do Departamento de Defesa Animal. No caso da tuberculose, todos os animais devem ser testados com tuberculina PPD mamífera a cada 12 meses. Caso haja positividade é recomendado o emprego da prova comparativa (BRASIL, 2011). Contudo, a despeito de constar da legislação, ainda não existe um consenso definitivo sobre a execução e interpretação do teste tuberculínico intradérmico aplicado na espécie suína, particularmente nos rebanhos acometidos por micobacterioses causadas por micobactérias do complexo MAIS, principal responsável por casos de linfadenite tuberculóide em suínos.

O Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS), do Brasil aprovado pela Instrução Normativa nº 19 de 15 de fevereiro de 2002, publicado no Diário Oficial da União de 01 de março de 2002, seção 1 (BRASIL, 2011), aplica-se ao controle sanitário oficial dos estabelecimentos de criação de suídeos que desenvolvam atividades relacionadas à produção, reprodução, comercialização, distribuição de suídeos e material de multiplicação de origem suídea. Trata também da vigilância da introdução de doenças exóticas e do controle ou erradicação das já existentes no Brasil.

Para fins de diagnóstico o PNSS recomenda a prova da tuberculinização comparada com tuberculina aviária e bovina inoculadas, na dose de 0,05 mg de PPD por via intradérmica (face dorsal da orelha) e a leitura feita com o auxílio de paquímetro ou régua. A leitura deve ser realizada 48 horas após a inoculação das PPDs aviária. A interpretação do teste é efetuada para o rebanho e não para o indivíduo e com base nos experimentos efetuados por Morés et al. (2006) em suínos experimentalmente infectados com *Mycobacterium avium* (MAC) e *M. bovis* ficou estabelecido que quando a média do maior diâmetro das reações para o PPD aviário ultrapassar o valor de 0,5 cm o rebanho está infectado por micobactérias oportunistas se o valor médio do diâmetro das reações for igual ou superior a 0,5 cm para o PPD bovino o rebanho está infectado por *M. bovis*.

A disponibilização de um instrumento de diagnóstico passível de aplicação nos suínos, que permita a diferenciação individual de animais infectados por microrganismos do complexo *M. tuberculosis* da provocada por micobactérias oportunistas poderá servir como instrumento para o monitoramento e vigilância epidemiológica dos rebanhos, possibilitando a implantação de medidas preventivas e de saneamento (HORSBURGH, 2007).

Oliveira et al. (1996) analisaram o valor diagnóstico do teste intradérmico comparativo de tuberculina, aplicada na base da orelha de leitões recém desmamados experimentalmente infectados pelas vias oral ou intramuscular com culturas vivas de *M. bovis*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare* ou *Rhodococcus equi*. O objetivo principal do trabalho foi à análise do valor diagnóstico de teste sorológico com técnica imunoenzimática. As reações à tuberculina bovina no grupo inoculado com *M. bovis* foram maiores que as observadas com a tuberculina aviária e nos testes intradérmicos efetuados em suínos dos grupos infectados com as outras espécies de microrganismos as reações foram maiores para a tuberculina aviária, porém não foi apresentada a mensuração das reações efetuadas.

Lilenbaum et al. (2002) examinando linfonodos de 73 suínos, adultos abatidos no Estado do Rio de Janeiro no ano de 2001, aparentemente saudáveis e livres de lesões na árvore respiratória, identificaram 21 (28,8%) indivíduos que apresentaram crescimento de micobactérias com predominância de estirpes pertencentes ao complexo *M. avium*.

A despeito de durante muito tempo ter se admitido que na tuberculose e micobacterioses a imunidade humoral era muito irregular e que isto prejudicava o emprego de testes diagnósticos que revelassem a presença de anticorpos, nos últimos anos, novas perspectivas vêm sendo obtidas com o emprego de diversos procedimentos, entre os quais

estão incluídas as reações imunoenzimáticas do tipo ELISA que passaram a ocupar uma posição de destaque (LILENBAUM, 1999; WISSELINK et al., 2010).

Os ensaios imunoenzimáticos têm sido investigados em vários países, porém ainda tem sido pouco utilizados em condições de campo, pois há vários parâmetros a serem padronizados (OLIVEIRA et al., 1996).

Thoen (1979) investigou o valor diagnóstico de um teste de ELISA em suínos livres de agentes patogênicos específicos, experimentalmente infectados pelas vias oral ou endovenosa, com estirpe 4/8 de *Mycobacterium avium*, dois animais por grupo. Os antígenos fixados nas placas do teste de ELISA foram subculturas do *M. avium*, estirpe 4/8 ou tuberculinas PPD *M. avium*, estirpe D-4 ou *M. bovis*, estirpe AN-5. Apesar do pequeno número de animais examinados, foram constatadas reações cruzadas com o antígeno PPD de *M. bovis*, no grupo de suínos infectados por *M. avium*, pela via endovenosa.

Oliveira et al. (1996) avaliaram o comportamento de um teste de ELISA, aplicado ao diagnóstico da tuberculose ou micobacterioses em suínos recém-desmamados, experimentalmente infectados com micobactérias. As vias de infecção empregadas foram oral ou intramuscular. Os antígenos utilizados no teste de ELISA foram culturas sonicadas de *M. bovis* e *M. avium*, inativadas pelo calor. Os animais foram observados durante oito meses, com exames efetuados a cada dois meses. Os suínos do grupo controle, não infectados, apresentaram resultados negativos. Os suínos infectados com *M. bovis* apresentaram reações positivas no teste de ELISA com os dois tipos de antígenos empregados: aviário e bovino.

As investigações sobre o emprego dos testes de ELISA no diagnóstico da tuberculose animal têm trabalhado principalmente com a espécie bovina e os resultados obtidos tem sido variáveis de acordo com os procedimentos adotados para a extração e purificação dos antígenos. As preparações inicialmente investigadas incluindo bactérias sonicadas (AUER, 1987), filtrados de cultivos não aquecidos (FIFIS et al., 1989; PLACKETT et al., 1989), derivado protéico purificado (PPD) de culturas aquecidas (RITACCO et al., 1987; RITACCO; BARRERA; KANTOR, 1990) e extratos fosfatídicos apresentaram baixa especificidade. A busca da melhoria da especificidade dos testes tem conduzido ao emprego de antígenos purificados como a proteína recombinante MPB70, (MCNAIR et al., 2001) ou o complexo Ag85. A proteína MPB70 representa mais de 10% das proteínas secretadas no meio de cultura de *M. bovis* e foi anteriormente identificada como imunodominante em bovinos tuberculosos. A MPB70 é uma proteína recombinante preparada, purificada e utilizada como antígeno de captura segundo a técnica descrita por McNair et al. 2001. Essa proteína é secretada por

micobactérias e está envolvida na ligação com as proteínas das células do hospedeiro e são altamente específicas para *Mycobacterium bovis* (WILKER, 2009). No diagnóstico da tuberculose bovina, os testes imunoenzimáticos têm sido indicados como complementares aos clássicos testes intradérmicos, particularmente dirigidos para a identificação de animais anérgicos, não revelados pelos testes imunoalérgicos e que poderão perpetuar a infecção nos rebanhos (WOOD et al., 1992).

Lilenbaum, Pessolani e Fonseca (2001) efetuaram o diagnóstico da tuberculose em 104 bovinos de 13 propriedades leiteiras do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, utilizando o teste de ELISA com antígeno proteico do complexo Ag85. Os valores de sensibilidade e especificidade obtidos foram respectivamente de 91,3% e 94,8%.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico da tuberculose e micobacterioses em suínos “in vivo” é ainda um ponto controverso, os critérios preconizados no Brasil foram obtidos por investigações efetuadas com infecções experimentais cujos resultados permitiram apenas uma interpretação de rebanho, onde o ponto discriminador foi estabelecido com o valor médio de 0,5 cm no diâmetro das reações dos animais examinados, segundo o tipo de PPD.

Em ensaios experimentais efetuados com estirpe de micobactéria patogênica há diversas fontes de variações não controladas que afetam as relações intrínsecas hospedeiro - parasita e que poderão comprometer os resultados obtidos. Desde modo o presente trabalho optou pela padronização dos testes imunoalérgico e imunoenzimáticos aplicado no diagnóstico da tuberculose ou micobacterioses em grupos de suínos controlados experimentalmente e sensibilizados via intramuscular com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium* inativados de modo a permitir uma resposta imunológica mais homogênea do que a obtida nas infecções experimentais, com micobacterias vivas efetuadas pelas via oral ou nasal.

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Investigar o valor diagnóstico da resposta alérgica cutânea à tuberculina e do ELISA Indireto de Captura em suínos experimentalmente sensibilizados, de modo a diferenciar a resposta induzida por *M. bovis* do *M. avium* e tendo o *M. avium* como indicador da sensibilização provocada por micobactérias ambientais ou oportunistas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Estabelecer padrões (tamanho das reações e momento da leitura) para a interpretação da prova de tuberculina comparada em suínos com base nas características de sensibilidade e especificidade obtidas com o cotejamento de reações homólogas e heterólogas;
- ▶ Realizar a avaliação histológica da reação tuberculínica em suínos;
- ▶ Caracterizar o valor diagnóstico do teste de ELISA indireto com antígeno purificado aplicado ao diagnóstico in vivo da tuberculose e micobacterioses em suínos experimentalmente sensibilizados.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a execução do estudo proposto foram utilizados os seguintes materiais:

4.1 ANIMAIS

Os animais foram provenientes de uma granja comercial de suínos, localizada no Município de Ibiúna, no Estado de São Paulo que trabalha com ciclo completo em um rebanho de 200 matrizes híbridas das raças Landrace e Large White, inseminação em 100% das reprodutoras. Neste rebanho em atividade há 32 anos nunca foram observados animais com lesões sugestivas de tuberculose ou micobacterioses. Os 91 leitões utilizados, foram mantidos no esquema de manejo usual da granja. Ao nascimento, todos foram identificados com marcação numérica nas orelhas pelo sistema australiano (MAQUEDA, 1999; LIMA; OLIVEIRA; FIALHO, 2004).

Até os 21 dias de vida os leitões foram mantidos em celas parideiras individuais e micro ambiente com aquecimento e aleitamento materno (Figura 1). Após os 21 dias, foram desmamados e encaminhados ao setor de creche em baias coletivas de alvenaria, onde permaneceram até os 45 dias de vida com aquecimento, ração balanceada e água à vontade (Figura 2). A idade dos animais foi obtida por meio de um sistema de informação (software) utilizado na granja, *suinsoft*[®]. Após os 45 dias os animais foram destinados à área de engorda onde permaneceram até o momento do abate.

Os animais utilizados pertenciam a grupos de leitegadas submetidas ao teste imunoalérgico intradérmico comparado com tuberculina mamífera e aviária, na base da orelha, não tendo apresentado qualquer tipo de reação. O teste de triagem foi efetuado quando os animais apresentavam 30 dias de idade. Em cada etapa do experimento foi colhido sangue destinado à investigação do valor diagnóstico do ensaio de imunidade humoral, ELISA (ANEXO A).

Figura 1 – Animais com 21 dias de vida foram mantidos em celas parideiras individuais e micro ambiente com aquecimento e aleitamento materno

Fonte - Própria

Figura 2 – Setor de creche em baias coletivas de alvenaria

4.2 EXAMES FÍSICOS

Na constituição dos grupos experimentais, os suínos foram submetidos ao exame físico (SMITH; SHERMAN, 1994), com avaliação do estado geral, das mucosas conjuntivas e da monitoração das funções vitais (frequência dos movimentos respiratórios, dos batimentos cardíacos e temperatura corporal). Todos os animais utilizados apresentavam condição de saúde normal, para a respectiva faixa etária.

4.3 SENSIBILIZANTES

Os inóculos sensibilizantes foram preparados pelo Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – LARA-MAPA, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, e consistiram de suspensões inativadas de *M. avium* estirpe D4, lote IA 01/08 com fabricação em maio de 2008 e de *M. bovis* estirpe AN5, lote IB 01/09 com fabricação em maio de 2009 preparadas segundo as recomendações do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1980). A validade dos inóculos é de dois anos (BRASIL, 2011).

4.4 SENSIBILIZAÇÃO

Decorridos 60 dias do teste tuberculínico utilizado como triagem inicial, tempo esperado para que desaparecesse qualquer interferência do antígeno injetado, Tammemagi; Simmons, 1971, os animais foram sensibilizados com a aplicação via intramuscular na tábua do pescoço dos inóculos padrões e dos respectivos controles (dia experimental zero). Os 91 suínos recém-desmamados foram distribuídos em dois grupos com 25 indivíduos e outros dois grupos um deles contendo 21 e o outro 20 animais balanceando-se as características de raça, linhagem, faixa etária e sexo. O grupo A, recebeu a injeção intramuscular de 0,5 mL de uma suspensão oleosa, inativada de *M. avium* estirpe D4; o grupo B, recebeu 0,5 mL de uma suspensão oleosa, inativada de *M. bovis* estirpe AN5; o grupo C (controle I), recebeu 0,5 mL

do adjuvante oleoso e o grupo D (controle II), recebeu 0,5 mL de salina (solução fisiológica). As doses foram aplicadas segundo o protocolo disponibilizado pelo LANAGRO Minas Gerais.

4.5 TUBERCULINIZAÇÃO

Decorridos 30 dias da sensibilização, foi realizado o teste comparativo de tuberculina, injetando-se 0,1 mL de PPD aviário (tuberculina aviária) e 0,1 mL de PPD bovino (tuberculina bovina), via intradérmica, na base da orelha. Orelha esquerda, PPD bovino e orelha direita, PPD aviário. Para aplicação das tuberculinas, foram utilizadas seringas e agulhas de insulina, cuidando-se para que por ocasião da aplicação houvesse a formação de uma pequena elevação da pele, semelhante a uma lentilha. A medida da espessura da pele foi efetuada com paquímetro (mensuração da espessura da dobra da pele), às 0, 24, 48 e 72 horas após a injeção da tuberculina (Figura 3).

Foram utilizados PPD aviário contendo 0,5 mg/mL de tubérculo- proteínas e PPD bovino contendo 1 mg/mL produzidos pelo Instituto Biológico da Secretária de Agricultura do Estado de São Paulo, SP.

Figura 3- Mensuração da pele da orelha do animal, antes da aplicação do PPD bovino (A) na orelha esquerda e da aplicação do PPD aviário (B) na orelha direita para realização do teste comparativo e suas respectivas reações logo após a aplicação das PPDs (C e D)

Fonte - Própria

4.6 AMOSTRAS DE PELE

Por ocasião da ultima leitura do teste tuberculínico efetuado às 72 horas da aplicação das tuberculinas com o emprego de um *punch*, foram colhidas amostras de pele da região dorsal da orelha direita (PPD aviário) e orelha esquerda (PPD bovino), nos locais onde foi constatada a reação à tuberculina, em cinco animais do grupo A (sensibilizado com *M. avium*) e, cinco do grupo B (sensibilizado com *M. bovis*), bem como dos grupos controle: cinco do grupo C (sensibilizados com o adjuvante oleoso) e cinco do grupo D (sensibilizados com solução fisiológica).

O controle de pele normal foi obtido por biópsias de pele efetuadas na base da orelha de suínos que não foram submetidos a qualquer tipo de injeção intradérmica.

4.7 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Os fragmentos de pele do dorso da orelha dos animais, colhidos com o auxílio *punchs*² descartáveis para biópsia com 10 mm de diâmetro, foram fixados em formol a 10% tamponado em frascos estéreis, e encaminhados para o Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPT/ FMVZ- USP), onde foram processados como segue: desidratação e diafanização na máquina (Leica TP 1020), inclusão em blocos de parafina em auto inclusor (Leica EG 1150H) e corte em micrótomo com cinco micrômetros de espessura. A seguir as amostras permaneceram em Banho Maria, por 30 segundos e subsequentemente foram mantidas em estufa por duas horas a 37°C. As colorações adotadas seguiram a metodologia Hematoxilina-Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

O exame dos cortes histológicos foi realizado em foto-microscópio de luz comum, Olympus e fotografado com câmera digital.

4.8 ELISA

Para a execução do teste de ELISA indireto seguiu-se as seguintes etapas:

4.8.1 Amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas de todos os 91 suínos, em três etapas diferentes: no dia (- 60), tuberculinização de triagem (animais com 30 dias de idade), na data do dia zero, sensibilização (animais c/ 90 dias de idade), na data do dia 30, tuberculinização (0 hora = animais c/120 dias de idade).

O sangue foi colhido por punção da veia jugular em volumes de 5mL por animal. As amostras de sangue foram mantidas a temperatura ambiente para que ocorresse a coagulação e no prazo máximo de duas horas após a colheita foram encaminhadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS/ FMVZ- USP), onde foram centrifugadas para obtenção dos soros transferidos para frascos de ependorf e

armazenados a -20°C . Após a conclusão da fase de campo as amostras de soro foram enviadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense, para a realização das provas de ELISA.

4.8.2. Elisa indireto com antígeno mpb 70

O protocolo para a realização da técnica ELISA indireta seguiu a descrição do trabalho desenvolvido por Marassi et al. (2009), padronizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense.

O teste ELISA indireto foi realizado em placas plásticas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (Nunc maxisorb® - USA), com 96 poços dispostos em 12 fileiras verticais, cada uma com oito poços, onde foi distribuído o antígeno. A placa foi sensibilizada com antígeno em diluição de 50:1 (0,5 microgr/mL) por poço, diluído em tampão carbonato na concentração de 0,05M com (pH 9,8) utilizado para cobrir as placas e os 96 poços, incubada *overnight* (média de 12h) a 8°C em câmara úmida. Após o período de incubação a solução de sensibilização foi descartada e as placas lavadas três vezes com tampão de lavagem, {PBS 0,05% de Tween 20 pH 7.2 e 0,2 M de NaCl}, em seguida foi realizado o bloqueio da placa com solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em {PBS 0,05% de Tween 20} e incubado por duas horas a 37°C . Após a incubação a solução de bloqueio foi descartada e a placa foi lavada uma vez com tampão de lavagem (PBS – T 20). A seguir foram adicionados 50 µl do soro diluído na concentração 1/100 em PBST 0,05% Tween 20 Leite Molico 1% e incubação a 37°C sob agitação por 60 minutos. Após o tempo de incubação, os soros foram descartados e a placa lavada cinco vezes com tampão de lavagem (PBS – T 20). Após a lavagem foram adicionados 50µl/poço do anticorpo secundário, um conjugado anti-imunoglobulina de suíno (Sigma – USA) marcado com peroxidase diluído (1/40.000), a reação foi revelada com TMB (tetrametilbenzidina) 1mg/mL em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a reação foi interrompida acrescentando 25 µl de ácido clorídrico (NHCl) 1N após 40 minutos. A leitura da densidade óptica (DO) foi efetuada em espectrofotômetro (modelo 680 BioRad, Bio-Rad Laboratories UK Limited/USA), no comprimento de onda de 450nm de luz.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

Foram calculados os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) superior e inferior para os diferentes tempos de leitura, por tratamento, das respostas homólogas e heterólogas (SAMPAIO, 1998). Foi utilizado o programa estatístico *Graphpad Instat* (Graphpad Prism – Canadá) (GRAPHPAD SOFTWARE, 1998) para a obtenção dos intervalos.

Os grupos analisados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Como em todas as comparações pelo menos um grupo apresentou distribuição não normal, foram utilizados testes não paramétricos para as análises. Para a comparação dos momentos de leitura por grupo, foi utilizado o teste de Friedman, e para as comparações entre grupos por momento de leitura foi utilizada a análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), com as comparações *post hoc* realizadas com o teste de Dunn (ZAR, 1999). O nível de significância adotado foi de 5% e os dados foram tabulados e processados com o programa estatístico BioEstat 5.

No teste de ELISA para a comparação dos momentos (- 60, zero e 30) em cada grupo foi utilizada análise de variância com dois critérios de classificação e comparações múltiplas pelo teste de Tukey, caso os dados apresentassem distribuição normal, e pelo teste de Friedman, caso os dados não apresentassem distribuição normal. Para a comparação dos grupos (A, B, C e D) em cada momento, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pelo teste de Dunn, uma vez que todos os grupos não apresentaram distribuição normal (ZAR, 1999).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

No decorrer da pesquisa o estado geral dos animais utilizados no experimento não apresentou qualquer alteração. Os animais não apresentaram modificações significativas nas funções vitais além das reações de hipersensibilidade esperadas.

6.1 TESTES IMUNO-ALÉRGICO CUTÂNEO

Os resultados do teste tuberculínico comparativo efetuado segundo o grupo experimental são apresentados nos quadros 1 a 4 e ilustrados nos gráficos de 1 a 8.

No Quadro 1 são apresentados os aumentos da espessura da pele da orelha esquerda e direita dos suínos nos momentos de leitura definidos (0h, 24h, 48h e 72h), medidos com o auxílio de um paquímetro (modelo digital). O aumento da espessura da pele do ponto de aplicação da tuberculinização dos animais do grupo A (animais sensibilizados com *M. avium*) apresentou valores variando de - 0,2 a 27,2 mm com média de 13,5 mm para o PPD aviário.

Quadro 1 – Espessura da pele (mm) dorsal da orelha de suínos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão oleosa de *Mycobacterium avium*, segundo o grupo, o número de identificação do animal, o momento da leitura, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina aviária e bovina

TESTE COMPARATIVO												
Grupo	Animal	0 hora (a. i.)		24 horas (p.i.)		48 horas (p. i.)		72 horas (p. i.)		PPDAB	PPDAA	Resultado
		PPDB	PPD A	PPDB	PPDA	PPDB	PPDA	PPD B	PPDA			ΔA- ΔB
A	28	2,2	2,5	4,0	11,0	3,0	24,5	40,0	20,0	37,8	17,5	- 20,3
A	36	2,8	2,8	5,8	9,0	22,0	34,0	10,0	14,0	7,2	11,2	4,0
A	47	2,9	2,8	9,2	8,5	5,0	20,0	3,5	16,0	0,6	13,2	12,6
A	49	2,0	2,2	11,0	9,5	14,0	25,0	5,0	25,0	3,0	22,8	19,8
A	50	2,2	2,5	11,5	11,5	20,0	23,0	4,0	14,0	1,8	11,5	9,7
A	58	2,5	3,0	8,0	9,5	4,0	4,0	3,8	3,0	1,3	0,0	- 1,3
A	62	2,0	2,2	10,0	8,2	4,8	25,5	3,0	10,0	1,0	7,8	6,8
A	67	2,0	2,8	3,8	3,2	2,2	22,0	5,0	18,0	3,0	15,2	12,2
A	73	2,4	2,8	8,2	9,0	4,8	29,0	4,0	20,0	1,6	17,2	15,6
A	80	2,2	2,2	5,2	8,0	3,5	4,2	3,0	4,0	0,8	1,8	1,0
A	84	3,0	3,5	7,5	3,5	5,5	2,7	2,5	4,0	- 0,5	0,5	1,0
A	93	2,5	3,2	5,8	6,1	10,0	21,0	12	22,3	9,5	19,1	9,6
A	97	3,2	3,4	5,0	7,2	10,0	18,0	2,2	20,0	- 1,0	16,6	17,6
A	121	2,5	2,9	6,0	6,0	3,0	24,8	3,2	15,0	0,7	12,1	11,4
A	130	3,1	2,8	5,0	8,0	2,5	36	3,0	24,0	- 0,1	21,2	21,3
A	133	2,8	3,0	3,2	3,2	4,5	3,8	2,8	2,8	0,0	- 0,2	- 0,2
A	135	2,4	2,5	8,0	9,0	2,0	28,0	2,0	24,0	- 0,4	21,5	21,9
A	136	3,3	3,5	8,5	9,2	11,6	29,0	2,8	25,0	- 0,5	21,5	22
A	139	3,2	2,5	9,2	9,8	20,0	30,0	22,0	24,0	18,8	21,5	2,7
A	142	2,7	3,4	6,2	8,5	26,0	28,0	27,0	30,0	24,3	26,6	2,3
A	145	3,4	3,4	8,0	8,0	13,0	26,0	5,0	20,0	1,6	16,6	15
A	146	3,0	2,8	8,0	8,0	10,0	30,0	10,0	30,0	7,0	27,2	20,2
A	149	3,2	3,2	6,8	7,5	16,5	18,0	10,0	11,0	6,8	7,8	1,0
A	201	3,2	3,4	4,0	7,0	3,5	21,0	4,0	10,0	0,8	6,6	5,8
A	202	3,0	3,3	2,7	3,5	3,5	3,8	3,0	3,8	0,0	0,5	0,5
	Média	2,71	2,90	6,82	7,68	9,00	21,25	7,71	16,40	5,0	13,5	9,7
	Desvio	0,45	0,42	2,41	2,30	7,12	9,98	9,12	8,50	9,17	8,54	7,78
	IC									3,59	3,35	3,05
	IC i									1,41	10,15	6,69
	IC s									8,60	16,84	12,79

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); ICs = intervalo de confiança superior (95%).
a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação do PPD bovino e aviário, antes da injeção da tuberculina.
p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação do PPD bovino e aviário, após a injeção da tuberculina.
PPD = Derivado Protéico Purificado.
PPD A = tuberculina aviária.
PPD B = tuberculina bovina.
PPD AB = diferença final da espessura da pele em mm (entre 72h e 0h), no local da aplicação do PPD bovino.
PPD AA = diferença final da espessura da pele em mm (entre 72h e 0h), no local da aplicação do PPD aviário.
ΔA-ΔB= diferença das diferenças.

O aumento da espessura da pele em milímetros (mm), na região dorsal da orelha dos animais do grupo A atingiu a maior intensidade às 48 horas da aplicação das tuberculinas aviária e bovina, apresentando um aumento médio de 21,25 mm de espessura da pele para o PPD aviário. A reação provocada pela aplicação do PPD bovino apresentou o valor médio máximo também em 48 horas, com um aumento de nove milímetros de espessura (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Médias aritméticas da espessura da pele, expressas em milímetros (mm), de suínos sensibilizados com suspensão oleosa de *M. avium* segundo o tipo de tuberculina empregada e o momento da leitura do teste comparativo

GRUPO A – animais sensibilizados com suspensão oleosa de *M. avium*.
 p.i: pós inoculação
 PPD A = tuberculina aviária.
 PPD B = tuberculina bovina.

No quadro 2 são apresentados os aumentos da espessura da pele da orelha dos suínos do grupo B (sensibilizados com *M. bovis*). Os valores observados variaram de 0,1 a 35,8 mm com média de 14,39 mm para o PPD bovino.

Quadro 2 – Espessura da pele (mm), dorsal da orelha de suínos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão oleosa de *Mycobacterium bovis*, segundo o grupo, o número de identificação do animal, o momento da leitura, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária

Grupo	Animal	0 hora (a. i.)		24 horas (p. i.)		48 horas (p. i.)		72 horas (p. i.)		PPD ΔB	PPD ΔA	Resultado $\Delta B - \Delta A$
		PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A			
B	27	2,8	2,2	5,2	3,8	21,0	3,0	22,2	3,0	19,4	0,8	18,6
B	30	2,8	2,8	5,8	5,0	23,2	4,2	24,0	2,5	21,2	- 0,3	21,5
B	32	2,2	2,3	11,0	9,8	26,0	34,0	20,0	17,0	17,8	14,7	3,1
B	35	2,7	2,8	9,2	5,5	7,8	5,5	10,0	8,0	7,3	5,2	2,1
B	37	1,8	1,8	8,5	3,2	3,2	3,0	10,0	3,0	8,2	1,2	7,0
B	40	2,8	2,5	3,0	4,5	3,8	2,8	20,0	3,5	17,2	1,0	16,2
B	46	2,2	2,0	10,5	9,0	25,0	2,0	38,0	22,0	35,8	20,0	15,8
B	48	1,8	2,2	9,5	6,5	4,2	4,2	10,0	2,8	8,2	0,6	7,6
B	85	2,9	3,0	5,2	5,0	21,0	14,0	21,0	15,0	18,1	12,0	6,1
B	87	2,8	2,8	6,2	6,0	14,0	12,0	38,0	25,0	35,2	22,2	13,0
B	90	3,0	3,0	6,0	3,1	5,8	3,5	10,0	3,0	7,0	0,0	7,0
B	98	2,8	2,5	3,5	2,5	3,0	2,5	2,9	2,2	0,1	0,3	- 0,2
B	101	3,2	3,7	6,0	3,8	3,9	3,5	12,0	3,8	8,8	0,1	8,7
B	103	3,2	3,2	4,0	8,0	18,0	5,0	20,0	5,0	16,8	1,8	15,0
B	105	3,2	3,0	8,5	3,0	15,0	3,0	10,0	3,5	6,8	0,5	6,3
B	111	3,4	3,4	7,0	4,2	3,8	3,5	3,5	3,0	0,1	- 0,4	0,5
B	113	3,0	3,0	7,0	4,8	10,0	3,0	10,0	3,0	7,0	0,0	7,0
B	124	3,4	3,2	7,0	7,0	25,3	6,0	20,0	3,8	16,6	0,6	16,0
B	128	3,6	2,8	9,5	7,5	34,0	22,0	21,0	15,0	17,4	12,2	5,2
B	134	3,6	3,4	7,8	3,8	9,0	3,2	14,0	3,0	10,4	- 0,4	10,0
B	140	3,2	3,2	5,5	3,8	17,0	13,0	29,0	14,0	25,8	10,8	15,0
B	143	3,8	3,3	6,5	3,2	17,0	3,9	20,0	3,5	16,2	0,2	16,0
B	144	3,4	3,2	8,0	5,5	10,0	5,0	13,0	2,0	9,6	- 1,2	10,8
B	147	3,0	2,3	7,0	5,0	12,0	9,8	15,0	10,0	12,0	7,7	4,3
B	200	3,2	3,2	8,5	6,0	25,7	12,0	20,0	7,0	16,8	3,8	13,0
	Média	2,95	2,83	7,04	5,18	14,35	7,34	17,34	7,34	14,39	4,54	9,82
	Desvio	0,52	0,49	2,08	1,93	9,02	7,38	8,93	6,70	8,97	6,81	5,92
	IC									3,52	2,67	2,32
	ICi									10,87	1,87	7,50
	ICs									17,91	7,21	12,14

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação do PPD bovino e aviário, antes da injeção da tuberculina.

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação do PPD bovino e aviário, após a injeção da tuberculina.

PPD = Derivado Protéico Purificado

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina.

PPD ΔB = diferença final da espessura da pele em mm (entre 72h e 0h), no local da aplicação do PPD bovino.

PPD ΔA = diferença final da espessura da pele em mm (entre 72h e 0h), no local da aplicação do PPD aviário.

$\Delta B - \Delta A$ = diferença das diferenças.

O aumento da espessura da pele em milímetros (mm), na região dorsal da orelha dos animais do grupo B, atingiu a magnitude máxima às 72 horas após a aplicação das tuberculinas aviária e bovina alcançando um aumento médio de 17,34 mm de espessura da pele para o PPD bovino no momento da leitura. A reação provocada pela aplicação do PPD aviário apresentou o valor médio máximo às 48 horas e permaneceu neste valor até às 72 horas com um aumento médio de 7,34 mm de espessura (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Médias aritméticas da espessura da pele, expressas em milímetros (mm), de suínos sensibilizados com suspensão oleosa de *M. bovis*, segundo o tipo de tuberculina empregada e o momento da leitura do teste comparativo

GRUPO B – animais sensibilizados com suspensão oleosa de *M. bovis*.

p.i.: pós inoculação

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina.

No Quadro 3 são apresentados os aumentos da espessura da pele da orelha dos suínos, do grupo C (controle - animais inoculados com adjuvante oleoso). Os valores observados variaram de 0,0 a 2 mm com média de 0,49 mm para o PPD bovino e valores de – 1,4 a 1,2 mm com média de 0,05 mm para o PPD aviário.

Quadro 3 – Espessura da pele (mm) na região dorsal da orelha, de suínos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão de adjuvante oleoso, segundo o grupo, o número de identificação, o momento da leitura, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina aviária e bovina

Grupo	Animal	0 hora (a. i.)		24 horas (p. i.)		48 horas (p. i.)		72 horas (p. i.)		PPD ΔB	PPD ΔA	Resultado ΔA - ΔB
		PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A			
C	18	2,5	3,0	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,5	0,3	- 0,5	0,8
C	42	1,5	1,5	3,2	3,0	3,0	3,0	2,2	2,2	0,7	0,7	0,0
C	43	2,2	2,0	3,0	3,0	2,5	2,2	2,5	3,2	0,3	1,2	0,9
C	52	2,2	2,5	3,2	3,0	2,8	4,0	2,8	2,8	0,6	0,3	- 0,3
C	56	2,6	2,6	3,8	3,0	3,0	3,0	3,0	2,8	0,4	0,2	- 0,2
C	60	2,0	2,0	3,2	4,2	3,0	2,2	2,2	2,0	0,2	0,0	- 0,2
C	64	2,0	2,0	2,5	3,2	2,5	2,5	2,2	2,0	0,2	0,0	- 0,2
C	69	2,0	2,2	3,0	2,9	3,0	2,8	2,5	3,0	0,5	0,8	0,3
C	70	2,0	2,5	3,5	3,2	3,2	2,8	4,0	3,0	2,0	0,5	- 1,5
C	83	2,0	3,0	2,5	2,8	2,8	2,8	3,0	2,5	1,0	- 0,5	- 1,5
C	88	2,8	3,0	3,0	3,0	2,8	2,5	2,9	2,8	0,1	- 0,2	- 0,3
C	95	2,8	2,6	2,8	2,8	2,9	2,9	2,8	2,0	0,0	- 0,6	- 0,6
C	96	2,0	2,8	3,1	3,1	1,8	2,8	2,7	2,5	0,7	- 0,3	- 1,0
C	99	3,5	3,0	3,2	3,2	3,8	3,0	3,5	3,8	0,0	0,8	0,8
C	102	3,0	2,9	3,0	3,2	3,8	4,0	4,0	4,0	1,0	1,1	0,1
C	107	3,0	3,2	5,0	2,8	5,0	3,0	3,4	2,9	0,4	- 0,3	- 0,7
C	109	2,2	3,4	3,0	3,0	2,8	3,8	2,8	3,2	0,6	- 0,2	- 0,8
C	120	2,2	2,9	3,5	3,2	3,2	3,0	2,5	2,0	0,3	- 0,9	- 1,2
C	125	2,5	3,4	3,8	4,0	2,8	2,4	2,5	3,3	0,8	- 1,4	- 2,2
C	132	2,8	2,4	3,0	6,0	3,8	2,8	2,8	2,8	0,0	0,4	0,4
C	148	2,8	3,0	2,8	3,2	3,0	3,2	3,0	2,9	0,2	- 0,1	- 0,3
	Média	2,41	2,66	3,19	3,27	3,06	2,93	2,90	2,71	0,49	0,05	- 0,37
	Desvio	0,48	0,50	0,54	0,72	0,64	0,50	0,51	0,57	0,46	0,66	0,81
	IC									0,20	0,28	0,35
	ICi									0,29	-0,62	-0,71
	ICs									0,69	0,33	-0,02

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

a.i. = medida da espessura da pele em cm, no local da aplicação do PPD bovino e aviário, antes da injeção da tuberculina.

p.i. = medida da espessura da pele em cm, no local da aplicação do PPD bovino e aviário, após a injeção da tuberculina.

PPD= Derivado Protéico Purificado.

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina.

PPD ΔB = diferença final da espessura da pele em cm (entre 72h e 0h), no local da aplicação do PPD bovino.

PPD ΔA = diferença final da espessura da pele em cm (entre 72h e 0h), no local da aplicação do PPD aviário.

ΔA-ΔB= diferença das diferenças

O aumento da espessura da pele expresso em milímetros (mm), da pele da região dorsal da orelha dos animais do grupo C, atingiu o valor máximo às 24 horas da aplicação das tuberculinas aviária e bovina, alcançando um aumento de 3,19 mm de espessura da pele para o PPD bovino no momento da leitura. A reação provocada pela aplicação do PPD aviário apresentou o valor médio mais elevado às 24 horas com um aumento de 3,19 milímetros de espessura. As medidas do aumento da pele decaíram depois das 24 horas para as duas tuberculinas, PPD aviário e PPD bovino (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Médias aritméticas da espessura da pele, expressas em milímetros (mm), de suínos sensibilizados com suspensão de adjuvante oleosa segundo, o tipo de reativo e o momento da leitura do teste comparativo

GRUPO C – animais sensibilizados com o adjuvante (oleoso).

p.i.: pós inoculação

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina

No Quadro 4 são apresentados os aumentos da espessura da pele da orelha dos suínos do grupo D (inoculados com solução fisiológica). Os valores observados variaram de – 0,8 a 3,0 mm com média de 0,21 mm para o PPD bovino e valores de - 0,9 a 2,6 mm com média de 0,26 mm para o PPD aviário.

Quadro 4 – Espessura da pele (mm), na região dorsal da orelha, de suínos sensibilizados experimentalmente com solução fisiológica (0,9% NACL), segundo o grupo, o número de identificação, o momento da leitura, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre a reação à tuberculina aviária e bovina

Grupo	Animal	0 hora (a. i.)		24 horas (p. i.)		48 horas (p. i.)		72 horas (p. i.)		PPD ΔB	PPD ΔA	Resultado ΔA - ΔB
		PPD B PPD A		PPD B PPD A		PPD B PPD A		PPD B PPD A				
D	31	2,8	2,2	5,1	4,1	3,0	3,0	2,8	3,2	0,0	1,0	1,0
D	41	2,0	2,0	4,0	3,2	2,5	2,5	2,2	2,0	0,2	0,0	- 0,2
D	55	2,2	3,0	2,8	2,8	3,2	3,0	2,0	3,0	0,2	0,0	- 0,2
D	59	2,5	2,2	4,2	3,9	3,8	2,8	2,8	2,8	0,3	0,6	0,3
D	81	2,8	2,2	4,2	3,5	2,8	2,5	2,5	2,0	- 0,3	- 0,2	0,1
D	82	2,7	3,5	3,2	3,5	3,8	2,8	3,0	2,8	0,3	- 0,7	- 1,0
D	86	3,2	3,0	3,1	3,5	4,0	4,0	3,5	4,0	0,3	1,0	0,7
D	91	2,8	3,5	3,0	3,4	3,2	3,2	3,1	3,2	0,3	- 0,3	- 0,6
D	100	3,2	3,6	3,0	6,2	2,8	3,8	3,0	3,4	- 0,2	- 0,2	0,0
D	106	2,8	3,0	3,0	3,2	3,4	2,2	2,5	2,5	- 0,3	- 0,5	- 0,2
D	108	3,2	3,5	3,2	3,0	3,8	2,8	2,8	2,8	- 0,4	- 0,7	- 0,3
D	110	2,9	2,8	2,8	2,8	1,9	3,0	2,8	1,9	0,1	- 0,9	- 1,0
D	114	3,8	3,4	5,0	6,0	3,2	3,2	3,0	4,5	- 0,8	1,1	1,9
D	117	3,0	3,4	6,0	7,2	4,8	4,5	6,0	6,0	3,0	2,6	- 0,4
D	123	3,0	2,5	3,4	7,0	3,0	4,0	2,8	2,8	- 0,2	0,3	0,5
D	127	3,4	3,4	4,5	4,1	3,5	2,8	2,8	3,5	- 0,6	0,1	0,7
D	129	2,5	3,2	3,4	3,9	3,0	2,8	2,5	2,5	0,0	- 0,7	- 0,7
D	131	2,8	3,2	4,2	4,5	3,8	4,0	3,0	4,0	0,2	0,8	0,6
D	137	3,2	2,8	4,5	4,5	3,0	3,0	2,5	2,5	- 0,7	- 0,3	0,4
D	141	2,2	2,9	3,8	4,5	3,0	4,2	5,0	5,0	2,8	2,1	- 0,7
	Média	2,85	2,97	3,82	4,24	3,28	3,21	3,03	3,22	0,21	0,26	0,05
	Desvio	0,43	0,51	0,89	1,34	0,62	0,65	0,92	1,05	0,98	0,95	0,73
	IC									0,43	0,41	0,32
	ICi									-0,22	-0,16	-0,28
	ICs									0,64	0,67	0,37

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação do PPD bovino e aviário, antes da injeção da tuberculina.

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação do PPD bovino e aviário, após a injeção da tuberculina.

PPD = (Purified Protein Derivative – Derivado Protéico Purificado) = tuberculina.

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina.

PPD ΔB = diferença final da espessura da pele em mm (entre 72h e 0h), no local da aplicação do PPD bovino.

PPD ΔA = diferença final da espessura da pele em mm (entre 72h e 0h), no local da aplicação do PPD aviário.

ΔA-ΔB= diferença das diferenças

O aumento da espessura da pele expresso em milímetros (mm), da região dorsal da orelha dos animais do grupo D, atingiu o valor médio máximo às 24 horas da aplicação das tuberculinas bovina e aviária, alcançando o valor médio de 3,82 mm de espessura da pele para o PPD bovino no momento da leitura. A reação provocada pela aplicação do PPD aviário apresentou o valor médio mais elevado às 24 horas com um aumento médio de 4,24 mm de espessura, as medidas do aumento da pele decaíram depois das 24 horas se mantendo estável para as duas tuberculinas PPD aviário e PPD bovino (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Médias aritméticas da espessura da pele, expressas em milímetros (mm), de suínos sensibilizados com solução fisiológica segundo o tipo de reativo e o momento da leitura do teste comparativo

GRUPO D – animais sensibilizados com solução fisiológica.

p.i.: pós inoculação

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina.

Nos grupos de suínos sensibilizados com as estirpes padrão *M. avium* (Grupo A) e *M. bovis* (Grupo B), as reações homólogas apresentaram respostas ao PPD bovino com diferença estatística, na comparação múltipla dos grupos dois a dois, A e B, A e C, A e D, B e C, e B e D ($p < 0,05$) com relação à resposta ao PPD aviário houve diferença entre os grupos A e B, A e C, A e D, B e C, C e D ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios gerais dos aumentos de espessura da pele (mm) dos suínos, obtidos das medidas de todos os momentos das leituras, induzidos pelos PPD B (bovino) e PPD A (aviário), aplicados na região dorsal da orelha, segundo os grupos experimentais de suínos

Grupo	PPD Bovino	PPD Aviário
A	6,56 ^a	12,06 ^a
B	10,42 ^b	5,67 ^b
C	2,89 ^c	2,89 ^c
D	3,25 ^c	3,4 ^b

Nota: Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Grupo A – Animais sensibilizados experimentalmente com *M. avium*.

Grupo B – Animais sensibilizados experimentalmente com *M. bovis*.

Grupo C - Animais sensibilizados experimentalmente com adjuvante.

Grupo D - Animais não sensibilizados (Controle).

As reações homólogas, para as duas tuberculinas, apresentaram os limites de confiança variando de 10,15 a 17,91 mm (Quadros 1 e 2). As reações heterólogas situaram-se entre 1,41 e 7,21 mm e as reações inespecíficas entre – 0,22 e 0,67 mm (Quadros 1, 2 e 4). Os intervalos de confiança do grupo onde houve maior resposta à tuberculina bovina que para a aviária, variaram de 7,50 a 12,14 mm (Quadro 2). A média da reação homóloga ao PPD bovino foi de 14,39 mm e a heteróloga ao PPD aviário foi de 4,54 mm (Quadro 2).

O aumento médio de espessura da pele em milímetros, na região dorsal da orelha, atingiu a magnitude máxima às 48 horas da aplicação das tuberculinas aviária (Gráfico 5) para o grupo A e as 72 de aplicação da tuberculina bovina (Gráfico 6) para o grupo B. Com relação à comparação dos grupos por momento de leitura, houve diferença estatística significativa entre os grupos A e B, A e C, A e D no momento 24h ($p < 0,05$); entre os grupo A e B, A e C, A e D, B e C no momento 48h ($p < 0,05$); entre os grupos A e B, A e C, A e D no momento 72h ($p < 0,05$).

Em relação à comparação estatística entre os momentos de leitura por grupo, foi observado diferença no grupo A no momento 0 e 24h ($p < 0,05$); grupo B houve diferença entre 0 e 24h, 48, 72h ($p < 0,05$); para o grupo C houve diferença entre os momentos 0 e 24h, 24 e 48h, 24 e 72h ($p < 0,05$) e em relação ao grupo D houve diferença entre 0 e 24h, 24 e 48h, 24 e 72h ($p < 0,05$) houve diferença estatística. Entretanto não houve diferença estatística entre os grupos A e B às 72h (segundo momento de leitura) sendo este o mais indicado para a realização da leitura (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão (mm) dos aumentos de espessura da pele de suínos, revelados pelo PPD aviário, aplicado na região dorsal da orelha, segundo os grupos experimentais e os momentos de leitura

Grupos	Momento da leitura			
	0 hora (a. i.)	24 horas (p.i.)	48 horas (p.i.)	72 horas (p.i.)
A	2,90 ± 0,42 ^{aA}	7,68 ± 2,30 ^{aB}	21,25 ± 9,98 ^{aC}	16,40 ± 8,5 ^{aBC}
B	2,83 ± 0,049 ^{aA}	5,18 ± 1,93 ^{Bb}	7,34 ± 7,38 ^{bB}	7,34 ± 6,70 ^{Bbc}
C	2,66 ± 0,50 ^{aA}	3,27 ± 0,72 ^{Cb}	2,93 ± 0,50 ^{cAB}	2,71 ± 0,57 ^{cA}
D	2,97 ± 0,51 ^{aA}	4,24 ± 1,34 ^{bcB}	3,21 ± 0,65 ^{bcA}	3,22 ± 1,05 ^{bcA}

Nota: Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada momento de leitura ($p < 0,05$).

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local de aplicação do PPD aviário, antes da injeção da tuberculina.

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local de aplicação do PPD aviário, após a injeção da tuberculina.

Grupo A – Animais sensibilizados experimentalmente com *M. avium*.

Grupo B – Animais sensibilizados experimentalmente com *M. bovis*.

Grupo C – Animais sensibilizados experimentalmente com adjuvante.

Grupo D – Animais não sensibilizados (Controle).

Gráfico 5 – Valores médios da espessura da pele de suínos, expressos em milímetros, no local da aplicação do PPD aviário, segundo os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizado com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis*, Grupo C – sensibilizado com adjuvante e Grupo D (controle) e o momento da leitura do teste comparativo

p.i.: pós inoculação

PPD A = tuberculina aviária

Gráfico 6 – Valores médios da espessura da pele de suínos, expressos em milímetros, no local da aplicação do PPD bovino, segundo os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizado com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis*, Grupo C – sensibilizado com adjuvante e Grupo D (controle) e o momento da leitura do teste comparativo

p.i.: pós inoculação

PPD B = tuberculina bovina.

Com relação à comparação dos grupos por momento de leitura, foi constatada diferença significativa entre os grupos B e C em relação ao momento 0h ($p < 0,05$); entre os grupos A e C, A e D, B e C, B e D no momento 24h ($p < 0,05$); entre os grupo A e C, A e D, B e C, B e D no momento 48h ($p < 0,05$); entre os grupos A e B, A e C, B e C, B e D no momento 72h ($p < 0,05$). Em relação à comparação entre os momentos de leitura por grupo, houve diferença no grupo A no momento 0h em relação aos momentos 24, 48 e 72h ($p < 0,05$); grupo B houve diferença entre 0 e 24h, 0h e 48h e 0 e 72h ($p < 0,05$); para o grupo C houve diferença entre os momentos 0 e 24h, 0 e 48h ($p < 0,05$) e em relação ao grupo D houve diferença entre 0 e 24h, 24 e 72h ($p < 0,05$) (Tabela 3 e Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Reação inflamatória após a aplicação do PPD aviário após 72 horas

Fonte – Própria

Figura 5 - Reação inflamatória após a aplicação do PPD bovino após 72 horas

Fonte – Própria

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão (mm) dos aumentos de espessura da pele de suínos, com PPD bovino, aplicado na região dorsal da orelha, segundo os grupos experimentais e os momentos da leitura dos resultados

Grupos	Momento da leitura			
	0 hora (a.i.)	24 horas (p.i.)	48 horas (p.i.)	72 horas (p.i.)
A	2,71 ± 0,45 ^{aCA}	6,82 ± 2,41 ^{aB}	9,00 ± 7,12 ^{aB}	7,71 ± 9,12 ^{aB}
B	2,95 ± 0,52 ^{abA}	7,04 ± 2,08 ^{aB}	14,35 ± 9,02 ^{aBC}	17,34 ± 8,94 ^{bC}
C	2,41 ± 0,48 ^{CA}	3,19 ± 0,54 ^{bB}	3,06 ± 0,64 ^{bB}	2,90 ± 0,51 ^{cAB}
D	2,85 ± 0,43 ^{acA}	3,82 ± 0,89 ^{bB}	3,28 ± 0,62 ^{bAB}	3,03 ± 0,92 ^{aCA}

Nota: Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada momento de leitura ($p < 0,05$).

Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

a.i. = medida da espessura da pele em cm, no local de aplicação do PPD aviário, antes da injeção da tuberculina.

p.i. = medida da espessura da pele em cm, no local de aplicação do PPD aviário, após a injeção da tuberculina.

Grupo A – Animais sensibilizados experimentalmente com *M. avium* com adjuvante oleoso.

Grupo B – Animais sensibilizados experimentalmente com *M. bovis* com adjuvante oleoso.

Grupo C - Animais sensibilizados experimentalmente com adjuvante.

Grupo D - Animais não sensibilizados (Salina).

Nas reações obtidas com PPD bovino, os limites inferiores e superiores, das reações inespecíficas (grupo D) foram - 0,22 e 0,64 mm, com média de 0,21 mm. Os obtidos das reações heterólogas (grupo A) foram 1,41 e 8,60 mm, com média de 5,0 mm e das reações homólogas (grupo B) 10,87 e 17,91 mm, com média de 14,39 mm (Gráfico 7). A média das reações homólogas foi distinta da obtida nas reações heterólogas, não houve superposição de valores entre os intervalos de confiança dos três tipos de reações analisadas, como prova simples.

Gráfico 7 – Intervalo de confiança da variação da espessura da pele, expressa em milímetros (mm), no ponto de aplicação da tuberculina PPD bovina segundo o grupo experimental: grupo D (reações inespecíficas), grupo A (reações heterólogas) e grupo B (reações homólogas)

Legenda: Grupo A sensibilizado com *M. avium*
 Grupo B sensibilizado com *M. bovis*
 Grupo D sensibilizado com solução fisiológica

Nas reações obtidas com PPD aviário, os limites inferiores e superiores, das reações inespecíficas (grupo D) foram 0,16 e 0,67 mm, com média de 0,26 mm. Os obtidos nas reações heterólogas (grupo B) foram 1,87 e 7,21 mm, com média de 4,54 mm e nas reações homólogas (grupo A) 10,15 e 16,84 mm, com média de 13,50 mm (Gráfico 8). A média das reações homólogas foi distinta da obtida nas reações heterólogas e não houve superposição de valores entre os intervalos de confiança das três tipos de reações analisadas, como prova simples.

Gráfico 8 – Intervalo de confiança da variação da espessura da pele, expressa em milímetros (mm), no ponto de aplicação da tuberculina PPD aviário segundo o grupo experimental: grupo D (reações inespecíficas), grupo A (reações homogênea) e grupo B (reações heterôloga)

Grupo A: Suínos sensibilizados com *M. avium*,
 Grupo B: Suínos sensibilizados com *M. bovis*
 Grupo D: Suínos sensibilizados com solução fisiológica

Gráfico 9 – Intervalo de confiança da espessura da pele, expressa em milímetros (mm), segundo o grupo (A, B e D) e o tipo de reativo (tuberculina aviária / tuberculina bovina), em relação às diferenças (espessura da pele da tuberculina bovina menos aviária)

Legenda: Grupo A: Suínos sensibilizados com *M. avium*.
 Grupo B: Suínos sensibilizados com *M. bovis*.
 Grupo D: Suínos inoculados com solução fisiológica
 $\Delta B - \Delta A$ – Diferença entre a PPDB – PPDA.

A diferença entre os resultados dos dois grupos A e B conferiu o valor dos animais suspeitos, apresentando como resultado para o teste alérgico cutâneo os seguintes valores de referência para os suínos, valores menores que 6,7 mm são considerados negativos; entre 6,7 – 7,5 mm suspeitos e acima de 7,5 mm positivo (Gráfico 9).

O gráfico 10 ilustra o momento em que o Grupo A, sensibilizado com *M. avium* em adjuvante oleoso, apresentou o aumento médio máximo da espessura da pele as 48hs da aplicação das tuberculinas decaindo a partir deste momento, em oposição as reações de maior intensidade observadas no grupo sensibilizado com *M. bovis* com adjuvante oleoso, grupo B que ocorreram às 72 horas. Os Grupos C e D se mantiveram constantes, com valores muito próximos a zero.

Gráfico 10 – Valores médios das diferenças entre a espessura da pele de suínos, medidas nos locais da reação ao PPD bovino e aviário, em milímetros, segundo os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizados com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis*, Grupo C – sensibilizado com adjuvante e Grupo D (controle) e o momento da leitura do resultado do teste comparativo

p.i.: pós inoculação

6. 2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

No estudo histológico das amostras de pele colhidas da orelha de suínos do grupo controle não sensibilizados e não desafiados (Grupo E), do Grupo D constituído por animais inoculados com solução fisiológica e desafiados com PPD aviário (orelha direita) e PPD bovino (orelha esquerda), não foram observadas lesões dignas de nota (Figura 6).

Figura 6 - Corte histológico da região dorsal da orelha dos suínos. (A) Imagem representativa do grupo E – não sensibilizados nem desafiados; (B) imagem representativa do grupo D – não sensibilizados e desafiados com as PPD aviário e bovino. Observou-se ausência de alteração histopatológica digna de nota em ambos os grupos. HE (40x)

Os animais pertencentes ao grupo controle (Grupo C), sensibilizados com o adjuvante oleoso e desafiados com PPD aviário (orelha direita) e PPD bovino (orelha esquerda), apresentaram uma fraca reação inflamatória no local da aplicação das tuberculinas após 72 horas da sua realização (Figura 7). A intensidade do infiltrado foi ligeiramente maior na orelha que recebeu PPD aviário.

Figura 7 – Corte histológico da região dorsal da orelha de suíno sensibilizados com adjuvante oleoso e desafiados 72 horas após desafio com tuberculinas aviária e bovina – Grupo C (animais inoculados com adjuvante oleoso). (A) imagem representativa de pele após desafio com PPD aviário; (B) imagem representativa de pele após desafio com PPD bovino. Ambos apresentaram presença de discreto infiltrado inflamatório linfocítico predominantemente na região subepidérmica. HE (200x)

O teste de tuberculina utilizando o PPD aviário desencadeou uma reação inflamatória mononuclear multifocal discreta na região subepidérmica. Esta reação tornou-se mais intensa na região da derme, caracterizando-se por infiltrado mononuclear (linfócitos e macrófagos) que envolvia vasos sanguíneos e folículos pilosos difundindo-se entre as fibras, tecido adiposo e glândulas sudoríparas. Notou-se discreta separação de fibras (edema) na região subepidérmica, estendendo-se até a derme, nos animais sensibilizados com *M. avium* (Grupo A – reação homóloga) quando comparado com os animais sensibilizados com *M. bovis* (Grupo B – reação heteróloga), estes, desenvolveram apenas uma reação inflamatória multifocal discreta. (Figura 8).

Figura 8 - Corte histológico da região dorsal da orelha de suíno 72 horas após desafio com PPD aviário. Imagens representativas de (A) animais sensibilizados com *M. avium* (grupo A – reação homóloga); (B) animais sensibilizados com *M. bovis* (grupo B – reação heteróloga) HE. (200x)

Às 72 horas da aplicação intradérmica da tuberculina PPD bovina nos suínos dos grupos A e B apresentaram reações inflamatórias com maior infiltrado mononuclear e semelhante quando desafiados com PPD bovino (reações homóloga e heteróloga respectivamente). As características histológicas diferiram dos animais que receberam PPD aviário apenas na extensão da reação, com presença de células mononucleadas (linfócitos e macrófagos), na região subepidérmica e dérmica. (Figura 9).

Figura 9 - Corte histológico da região dorsal da orelha de suíno 72 horas após desafio com PPD bovino. Imagens representativas de (A) animais sensibilizados com *M. bovis* (grupo B – reação homogênea); (B) animais sensibilizados com *M. avium* (grupo A – reação heteróloga). HE (200x)

6.3 ELISA

Os resultados do teste ELISA efetuado segundo o grupo experimental são apresentados no quadro 5 e ilustrados nos gráficos de 11 a 16.

No quadro 5 são apresentados os valores de densidade óptica (D. O.) nos suínos sensibilizados experimentalmente, nos momentos de leitura definidos (- 60, zero e 30), registrados pelo espectrofotômetro. O valor da densidade óptica dos animais do grupo A (animais sensibilizados com *Mycobacterium avium*), grupo B (animais sensibilizados com *Mycobacterium bovis*) e grupo C (animais sensibilizados com adjuvante oleoso) apresentaram valores variando de 0,01 a 0,14 de densidade óptica enquanto que o grupo D (animais sensibilizados com solução fisiológica) apresentou um valor variando de 0,01 a 0,05 de densidade óptica.

Quadro 5 – Valor da densidade óptica (D.O.) para o teste de ELISA em suínos sensibilizados experimentalmente com suspensões de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, adjuvante oleoso e solução fisiológica, segundo o grupo, o número de identificação do animal, o momento da colheita de sangue, o tipo de tuberculina aplicada e a diferença entre : reação à tuberculina aviária e bovina

Grupo	Anim.	-60	0	30	Grupo	Anim.	-60	0	30	Grupo	Anim.	-60	0	30	Grupo	Anim.	-60	0	30
A	28	0,01	0,01	0,02	B	27	0,03	0,07	0,13	C	42	0,02	0,01	0,00	D	41	0,03	0,01	0
A	36	0,08	0,10	0,14	B	30	0,00	0,08	0,18	C	43	0	0,01	0,02	D	55	0,01	0,01	0,03
A	47	0,01	0,02	0,01	B	32	0,06	0,04	0,06	C	52	0	0,01	0,01	D	59	0,01	0,02	0,02
A	149	0,02	0,02	0,02	B	35	0,04	0,06	0,09	C	56	0,01	0,01	0,01	D	81	0	0,01	0,01
A	50	0,01	0,01	0,01	B	37	0,03	0,06	0,11	C	60	0,01	0,14	0,01	D	82	0,01	0,01	0,01
A	58	0,09	0,06	0,12	B	40	0,03	0,02	0,05	C	64	0,01	0,01	0,01	D	86	0,01	0,01	0,01
A	62	0,10	0,05	0,13	B	46	0,03	0,07	0,23	C	69	0,01	0,01	0,01	D	91	0,01	0,01	0,01
A	67	0,04	0,03	0,04	B	48	0,02	0,06	0,08	C	70	0,01	0,01	0,01	D	100	0,01	0,01	0,01
A	173	0,05	0,05	0,06	B	85	0,04	0,05	0,12	C	83	0,01	0,01	0,01	D	106	0,01	0,01	0,01
A	180	0,05	0,05	0,03	B	98	0,02	0,11	0,14	C	88	0,01	0,01	0,05	D	108	0	0,01	0,01
A	84	0,08	0,07	0,04	B	103	0,06	0,06	0,07	C	95	0,05	0,01	0,03	D	110	0,01	0,02	0,01
A	93	0,05	0,05	0,03	B	105	0,07	0,06	0,08	C	96	0	0,01	0,04	D	114	0,01	0,02	0,04
A	97	0,07	0,06	0,04	B	111	0,06	0,06	0,07	C	99	0,02	0,04	0,02	D	117	0,03	0,03	0,04
A	121	0,07	0,06	0,03	B	113	0,09	0,10	0,14	C	102	0	0,01	0,01	D	123	0,01	0	0,05
A	133	0,07	0,05	0,03	B	124	0,09	0,13	0,20	C	107	0,02	0,03	0,00	D	127	0,01	0,01	0,01
A	135	0,04	0,05	0,03	B	140	0,09	0,10	0,11	C	109	0,01	0,01	0,02	D	129	0,01	0,01	0,01
A	136	0,04	0,02	0,06	B	143	0,07	0,06	0,09	C	120	0	0,01	0,00	D	131	0,01	0,01	0,01
A	139	0,01	0,00	0,01	B	144	0,08	0,12	0,10	C	125	0,01	0,01	0,01	D	137	0,01	0,01	0,01
A	142	0,06	0,05	0,06	B	147	0,07	0,08	0,13	C	132	0,01	0,01	0,01	D	141	0,01	0,01	0,01
A	145	0,04	0,03	0,07	B	...	...	...	...	C	148	0	0,01	0,05	D	...	...	...	...
A	146	0,02	0,04	0,04	B	...	...	...	...	C	...	...	...	...	D	...	...	...	...
Média		0,05	0,04	0,05	Média		0,05	0,07	0,12	Média		0,01	0,02	0,02	Média		0,01	0,01	0,02
Desvio		0,03	0,02	0,04	Desvio		0,03	0,03	0,05	Desvio		0,01	0,03	0,01	Desvio		0,01	0,01	0,01
IC		0,01	0,01	0,01	IC		0,01	0,01	0,02	IC		0,00	0,01	0,00	IC		0,00	0,00	0,00
ICs		0,06	0,05	0,06	ICs		0,06	0,08	0,14	ICs		0,01	0,03	0,02	ICs		0,01	0,01	0,02
ICi		0,04	0,03	0,04	ICi		0,04	0,06	0,10	ICi		0,01	0,01	0,02	ICi		0,01	0,01	0,02

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

D. O. = Densidade óptica

PPD = Derivado Protéico Purificado.

- 60 = Realização da tuberculinização de triagem nos suínos.

0 = Realização da sensibilização nos suínos.

30 = Realização da tuberculinização.

... = Dado inexistente.

Na colheita de sangue efetuada por ocasião da triagem dos leitões recém-desmamados aos 21 dias de idade (dia experimental – 60), os valores obtidos no teste de ELISA empregando o antígeno MPB 70 apresentaram valores de densidade óptica inferiores a 0,10 nos quatro grupos experimentais com médias de 0,05 D. O. para os grupos A e B e de 0,01 D. O. para os grupos C e D, não sendo constatado diferença significativa entre os grupos A e B e entre os grupos C e D $p > 0,05$, todos os valores obtidos nesta etapa foram considerados como inespecíficos e sem valor diagnóstico.

Na colheita de sangue efetuada no dia experimental zero, momento em que os suínos foram sensibilizados com as suspensões oleosas de micobacterias inativadas, solução fisiológica ou apenas o adjuvante oleoso, pode-se constatar que os valores das médias de densidade óptica ao teste de ELISA com antígeno MPB 70 foram de 0,04; 0,07; 0,02 e 0,01, respectivamente para os grupos A, B, C e D. De fato pode-se observar que todos os animais pertencentes ao grupo A apresentaram valores $\leq 0,10$ D. O. e que três animais do grupo B apresentaram valores superiores a 0,10 (Gráficos 11 e 12), não sendo constatado diferença significativa entre os grupos A e B e entre os grupos C e D $p > 0,05$.

Na colheita de sangue efetuada no dia experimental 30 (30 dias após a sensibilização dos suínos), pode-se constatar que os valores das médias de densidade óptica ao teste de ELISA com antígeno MPB 70 foram de 0,05; 0,12; 0,02 e 0,02, respectivamente para os grupos A, B, C e D. Portanto pode-se observar que todos os animais pertencentes ao grupo A apresentaram valores $\leq 0,10$ D. O. com exceção de três animais e que onze animais do grupo B apresentaram valores $\geq 0,10$ (Gráficos 11 e 12), sendo constatado diferença significativa entre os grupos A e B, A e C, A e D, B e C, B e D $p < 0,05$ e entre os grupos C e D não houve diferença estatística com $p > 0,05$.

Estes resultados indicaram que a aplicação de tuberculina PPD bovina efetuada por ocasião da triagem provocou um estímulo imunológico que apresentou maior intensidade nos animais do grupo B, já os valores observados nos animais dos grupos A, C e D não apresentaram qualquer diferença com os respectivos valores observados quando da triagem (dia – 60) e deste modo confirmaram a ausência de qualquer exposição não controlada no transcorrer do tempo compreendido entre os dias experimentais – 60 e zero (Gráficos 11, 12, 13 e 14).

GRÁFICO 11 - Avaliação da resposta humoral dos suínos do grupo A, sensibilizados com *M. avium*, pela técnica de ELISA indireto, segundo o momento experimental

Grupo A - animais sensibilizados com *M. avium*.

GRÁFICO 12 - Avaliação da resposta humoral dos suínos do grupo B, sensibilizados com *M. bovis* pela técnica de ELISA indireto, segundo o momento experimental

Grupo B – animais sensibilizados com *M. bovis*.

GRÁFICO 13 - Avaliação da resposta humoral dos suínos do grupo C, inoculados com adjuvante oleoso, pela da técnica de ELISA indireto, segundo o momento experimental

Grupo C – animais sensibilizados com o adjuvante.

GRÁFICO 14 - Avaliação da resposta humoral dos suínos do grupo D, inoculados com solução salina, em diferentes períodos através da técnica de ELISA indireto, segundo o momento experimental

Grupo D – animais inoculados com solução fisiológica.

Na colheita de sangue do dia experimental 30, efetuada imediatamente antes do momento em que os animais foram submetidos ao teste tuberculínico comparativo final, apenas três animais do grupo A apresentaram valores ao teste de ELISA com antígeno MPB 70 superiores a 0,10 (Gráfico 11), já no grupo B dez animais apresentaram valores superiores a 0,10 e o valor médio do grupo foi de 0,12 D. O. (Gráfico 15).

Os valores obtidos nos animais dos grupos C e D permaneceram inalterados durante todo o período experimental permanecendo com a densidade óptica com média abaixo de 0,05 (Gráficos 13 e 14).

GRÁFICO 15 – Médias de densidade óptica no teste de ELISA indireto com antígeno MPB 70, segundo o grupo experimental, o momento da colheita do sangue e a etapa experimental

Grupo A - animais sensibilizados com *M. avium*.

Grupo B - animais sensibilizados com *M. bovis*.

Grupo C - animais sensibilizados com o adjuvante.

Grupo D - animais inoculados com solução fisiológica.

GRÁFICO 16 – Intervalos de confiança no teste de ELISA indireto com antígeno MPB 70, segundo o grupo experimental, o momento da colheita do sangue e a etapa experimental

Grupo A - animais sensibilizados com *M. avium*.

Grupo B - animais sensibilizados com *M. bovis*.

Grupo C - animais sensibilizados com o adjuvante.

Grupo D - animais inoculados com solução fisiológica.

O valor do teste de ELISA obtido no período - 60 (tuberculinização de triagem) apresentou superposição entre os grupos A e B com limites inferiores e superiores variando de 0,04 a 0,06 D.O. e entre os grupos C e D com o valor de 0,01, no período zero (sensibilização) os grupos A, B, C e D não demonstraram superposição entre os limites inferiores e superiores, variando respectivamente de 0,03 a 0,05; 0,06 a 0,08; 0,01 a 0,03 e 0,01, no período 30 (tuberculinização) observa-se o maior valor para o grupo B com 0,10 a 0,14 seguido pelo grupo A com 0,04 a 0,06 com superposição para os grupos C e D (Gráfico 16).

7 DISCUSSÃO

De acordo com o grupo experimental estabelecido, as reações observadas no teste imunoalérgico intradérmico comparativo em suínos experimentalmente sensibilizados com suspensões oleosas de *M. bovis* ou *M. avium*, permitiram a classificação das reações em: homólogas (PPD empregada produzida com o mesmo tipo de micobactéria utilizada para sensibilizar o animal); heteróloga (PPD empregada produzida com tipo de micobactéria distinto do utilizado para sensibilizar o animal) e reações inespecíficas (observadas em animais inoculados com adjuvante oleoso ou com solução salina - grupos controle).

As reações observadas com a tuberculina PPD *M. bovis* (Gráfico 7), nos animais sensibilizados com a suspensão oleosa de *M. avium* inativado (grupo A) considerada como heteróloga apresentaram o valor médio de 5,0 mm com intervalo de confiança (95%) variando de 1,41 a 8,6 mm já com o mesmo tipo de reativo as reações observadas nos animais sensibilizados com a suspensão oleosa de *M. bovis* inativado (grupo B), consideradas como homólogas, apresentaram o valor médio de 14,39 mm e o intervalo de confiança variando de 10,87 a 17,91 mm e no grupo D, controle, sensibilizado com solução fisiológica a média foi 0,21 mm e o intervalo de confiança (95%) apresentou os limites de - 0,22 a 0,64 mm. Constata-se, portanto inexistência de superposição de valores entre os três intervalos de confiança calculados, indicando que as reações obtidas por tipo isolado de tuberculina foram específicas não existindo a categoria de animais caracterizados como inconclusivos.

As reações observadas com a tuberculina PPD *M. avium* (Gráfico 8), nos animais sensibilizados com a suspensão oleosa de *M. bovis* inativado (grupo B) considerada como heteróloga apresentaram o valor médio de 4,54 mm com intervalo de confiança (95%) variando de 1,87 a 7,21 mm já com o mesmo tipo de reativo as reações observadas nos animais sensibilizados com a suspensão oleosa de *M. avium* inativado (grupo A), consideradas como homólogas, apresentaram o valor médio de 13,5 mm e o intervalo de confiança variando de 10,15 a 16,84 mm e no grupo D, controle, sensibilizado com solução fisiológica a média foi 0,26 mm e o intervalo de confiança (95%) apresentou os limites de - 0,16 a 0,67 mm. Constata-se, portanto inexistência de superposição de valores entre os três intervalos de confiança calculados, indicando que as reações obtidas por tipo isolado de tuberculina foram específicas não existindo a categoria de animais caracterizados como inconclusivos.

Os valores obtidos no teste comparativo onde foram estabelecidas as diferenças dos aumentos de espessura da pele de suínos, induzido pelo PPD bovino subtraído do encontrado com o PPD aviário ($\Delta B - \Delta A$), no teste intradérmico comparado na região dorsal da orelha, às 72 horas da aplicação da tuberculina, permitiram o estabelecimento da seguinte chave de interpretação: reação negativa, quando o aumento de espessura da pele for inferior a 6,7 mm (inespecífica); suspeita, quando o aumento estiver entre 6,7 e 7,5 mm (faixa de superposição dos limites inferiores) e positiva, quando o aumento da espessura da pele for maior ou igual a 7,5 mm (homóloga). De fato a observação dos intervalos de confiança construídos para os resultados do teste comparativo nos animais dos grupos A e B (Gráfico 9), revelaram a existência de superposição de valores nos limites inferiores: 6,69 e 7,50 respectivamente para os grupos A e B e, portanto esta faixa de valores em que o resultado do teste comparativo pode apresentar um resultado inconclusivo que não diferencia micobacteriose de tuberculose, contudo as reações do teste comparativo com diferença superior a 7,5 mm para uma dada tuberculina já podem ser consideradas como capazes de diferenciar uma infecção por *M. bovis* da provocada por uma micobacteriose ambiental ou oportunista.

A média aritmética dos resultados do teste comparativo nos animais dos grupos A e B (Quadros 1 e 2) foram entre os animais do grupo A (9,7 mm) aproximadamente 0,97 cm e o grupo B (9,82 mm), aproximadamente 0,98 cm, valores estes, portanto superiores ao preconizado pelo MAPA; 0,5 cm (BRASIL, 2004).

De fato os valores encontrados no presente trabalho, diferiram dos preconizados por Brasil (2004), estabelecidos a partir da investigação efetuada por Morés et al. (2006). Tal diferença poderia ser atribuída às diferenças no delineamento experimental adotado por este autor para o estabelecimento da infecção experimental nos suínos que empregou as vias oral e intranasal utilizando micobacterias vivas, o que difere do adotado no presente trabalho que utilizou suspensões oleosas de micobacterias mortas inoculadas pela via intramuscular, o que garantiu que uma quantidade fixa do inóculo fosse realmente apresentada ao sistema imune dos suínos, e isto não pode ser estabelecido no experimento realizado por Morés et al. (2006), pois uma parcela dos microrganismos inoculados em tal experimento poderia ter sido eliminada pelos mecanismos de defesa inata, inespecíficas (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

A despeito da importante contribuição oferecida por Silva et al. (2000); Morés et al. (2006) e Morés et al. (2010b); para o diagnóstico *in vivo* da tuberculose e micobacteriose suína, o tipo de procedimento adotado para o estabelecimento da infecção experimental pode ter induzido a respostas imunes variáveis, que interferiram na padronização dos critérios de interpretação das respostas obtidas e conseqüentemente na impossibilidade do

estabelecimento do diagnóstico individual. Já no presente trabalho tais fontes de variação foram minimizadas, pois a sensibilização dos animais pela via parenteral, com inóculo padronizado possibilitou a indução da resposta imune, com um estímulo antigênico uniforme, em um grupo de animais que possibilitou o cálculo de médias e análise estatística dos resultados obtidos. Desta forma foram controladas perdas de inóculo passíveis de ocorrer quando estabelecida a infecção pelas vias oral e intranasal, onde, segundo Salazar (2005), os mecanismos inespecíficos de defesa podem interferir com a instalação da infecção.

Na tuberculinização de suínos não pode ser utilizado apenas o *M. avium*, pois esta conduta excluiria o *M. bovis*, que é o agente patogênico de maior interesse para a saúde pública. Todavia não deve ser somente utilizado o *M. bovis*, pois este não faz parte do complexo das micobactérias que na atualidade, são mais frequentemente encontrados no Brasil em granjas de suínos comerciais. Martins et al. (1999), demonstraram que na região Sul do Brasil o *M. avium* é o responsável por 96,4% das ocorrências de micobacterioses em suínos, enquanto o *M. bovis* representa apenas 3,6% dos isolamentos de linfonodos com lesões granulomatosas.

O presente estudo observou que às 72 horas da aplicação do PPD de *M. avium* as reações intradérmica dos suínos, foram menores que as observadas na leitura efetuada às 48 horas da tuberculinização. Este resultado sugere a possibilidade da realização da leitura do teste já às 48 horas, contudo como os valores médios observados com o PPD de *M. bovis* foram de maior intensidade as 72 horas da aplicação, para que não haja discrepância recomenda-se a padronização do momento da leitura do teste as 72 horas da aplicação como já é adotado para outras espécies de animais (BRASIL, 2002).

No exame macroscópico das reações verificadas na parte dorsal da orelha dos suínos, foram constatado edema, eritema, sensibilidade ao toque, aumento da temperatura local, variando de tamanho e intensidade, apresentando em alguns animais uma úlcera no local da injeção (Figura 10), concordando com os achados macroscópicos de Mohamed; Ghada, Essam, (2009). Com relação ao exame microscópico das lesões foi observado um processo inflamatório, com intenso infiltrado de células mononucleares, já referido por Balian et al. (1997). As lesões macroscópicas e microscópicas observadas foram as de um processo inflamatório com a formação de pequenas reações alérgicas no ponto de aplicação das tuberculinas. Contudo Ray et al. (1972) afirmam que as lesões causadas por *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* e demais micobactérias em suínos não são diferenciáveis por exames macro e microscópicos.

Os resultados encontrados no presente trabalho no teste tuberculínico comparativo realizado em suínos, sensibilizados por *M. bovis* ou *M. avium* avaliados pelo aumento da espessura da pele nos locais da reação aos PPDS bovino e aviário demonstraram que a reação deve ser considerada negativa quando a variação decorrente da reação ao PPD bovino fosse menor que o aviário em até 6,7 mm; inconclusiva quando entre 6,7 a 7,5mm e positiva para micobacteriose ou tuberculose dependendo do tipo de PPD empregado, respectivamente *M. avium* ou *M. bovis*, quando a diferença das reações for superior a 7,5 mm.

Investigações já efetuadas em diferentes espécies de animais como bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos demonstraram que os critérios de interpretação da prova intradérmica de tuberculina, precisam ser ajustados por espécie, pois variam com a região do corpo onde é efetuado e com o tipo de constituição da pele da espécie animal examinado (ROXO et al., 1998; SILVA et al., 2006; CYRILLO et al., 2007; CORRÊA, 2008). Os valores padrões recomendados no Brasil, para o TCC aplicado no diagnóstico de tuberculose em bovinos e bubalinos expressos em milímetros são: 0 a 1,9 negativo; 2 a 3,9 suspeito e ≥ 4 positivo para a realização da leitura e interpretação do resultado do teste comparativo. Silva et al. (2006) consideraram: 0 a 1,8 negativo; 1,9 a 2,4 suspeito e $\geq 2,5$ positivo para a espécie caprina no TCC, em animais sensibilizados por estirpe padrão de *M. bovis*. Cyrillo et al. (2007) consideraram: 0 a 0,99 negativa; 1,0 a 1,9 suspeito e $\geq 2,0$ positivo para a espécie ovina no TCC.

O desempenho obtido no teste ELISA efetuado com o antígeno MPB 70 revelou que o mesmo foi capaz de identificar animais sensibilizados com *M. bovis*, porém não identificou animais sensibilizados com *M. avium*, achados estes diferentes dos obtidos por Oliveira et al. (1996) que empregaram o ELISA indireto, com antígeno sonificado *M. avium* em suínos previamente sensibilizados e encontraram leituras de densidade óptica maiores para o antígeno *M. avium*.

Wisselink et al. (2010), demonstraram a importância da utilização da técnica ELISA no diagnóstico da tuberculose nos suínos, ao desenvolverem um antígeno produzido com fração de lipídio do *M. avium* para detectar micobacteriose em suínos de abate porém este tipo de antígeno não foi empregado no presente trabalho.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

1 – O teste de tuberculinização intradérmica comparativo aplicado a suínos, permite a diferenciação de infecções provocadas por MAC das ocasionadas por *M. bovis*.

2 – Em suínos o teste de tuberculina comparativo (TC), efetuado na pele da região dorsal da orelha, com leituras as 48 ou 72 horas da aplicação, a diferença das diferenças inferior a 6,7 mm deve ser considerada como negativa; inconclusiva quando na faixa de 6,7 a 7,5 mm; e positiva quando for superior a 7,5 mm, interpretando-se como tuberculose por *M. bovis*, quando o maior valor for o obtido para PPD de *M. bovis*, ou micobacteriose, quando o maior aumento for para o PPD de *M. avium*.

3 – Nos exames histológicos, foi observado intenso infiltrado inflamatório linfocitário no local das reações intradérmicas dos animais testados com o PPD homologo ao tipo de micobactéria utilizada na suspensão oleosa sensibilizante.

4 – O ensaio do teste de ELISA indireto com antígeno MPB 70 foi capaz de detectar uma reação humoral nos animais sensibilizados com suspensões oleosas de *M. bovis*, podendo vir a se constituir em ferramenta valiosa para a vigilância epidemiológica da tuberculose por *M. bovis* em suínos.

5 – O ensaio do teste de ELISA indireto com antígeno MPB 70 não foi capaz de detectar uma reação humoral nos animais sensibilizados com suspensões oleosas de *M. avium*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica. Funções e distúrbios do sistema imunológico**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2009. 314p.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al **hombre y los animales**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. v.1, p. 266-283. (Publicación científica y técnica n. 580).

ASSIS, F. O.; MURATORI, A. M. Poluição hídrica por dejetos de suínos: um estudo de caso na área rural do município de quilombo, Santa Catarina. **Revista Eletrônica Geografar**, v. 2, n. 1, p. 42- 59, 2007.

ABIPECS . Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: < <http://www.abipecs.com.br> >. Acesso em: 10 de Outubro de 2011.

APCS . Associação Paulista da Cadeia Suinícola. Disponível em: < <http://www.suinopaulista.com.br> >. Acesso em: 10 de Outubro de 2011.

AUER, L. A. Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, n. 6, p. 172-176, 1987.

ALFREDSEN, S.; SKJERVE, E. An abattoir-based case- control study of risk factors for mycobacteriosis in Norwegian swine. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, p. 253-259, 1993.

BALIAN, S. C.; RIBEIRO, P.; VASCONCELLOS, S. A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S.; GUERRA, J. L.; XAVIER, J. G.; MORAIS, Z. M.; TELLES, M. A. S. Linfadenites tuberculóides em suínos abatidos no Estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 391-397 1997.

¹ * Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. rev. Atual e ampl. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84p.

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A. Clínica Veterinária. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983, p. 512-523.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa DAS/MAPA nº 19, de 15 fev. 2002. Normas para a Certificação de Granjas de Reprodutores Suídeos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 jun. 2004. 64p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa DAS/MAPA nº 47, de 18 jun. 2004. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade suídea** – Diário Oficial da União de 2004, Poder Executivo, Brasília – MAPA/DA/DAS, 2004, 64 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) – Manual técnico**. Brasília: MAPA/DAS/DSA, 2006. 184 p

BRASIL. Ministério da Saúde/SVS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em: 01 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. 2001. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/das/dda/in10.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Preparacion y estandarizacion de tuberculosis PPD. OPAS/ OMS. **Nota técnica**, v. 17, n. 1, p. 44, 1980.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. M. **Enfermidades Infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: Varela, 1992. 823 p.

CORRÊA, J. G. Z. **Estudo da resposta alérgica à tuberculina em caprinos (Capra hircus) experimentalmente sensibilizados, em diferentes regiões corpóreas**. 2008. 81p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2008.

CYRILLO, F. C.; LEAL, M. R. R.; MORENO, A.; MOTA, P. M. P. C.; SINHORINI, I. L.; VASCONCELLOS, S. A.; PINHEIRO, S. R.; BENESI, F. J. Teste de tuberculinização em ovinos (*Ovis aries*) experimentalmente sensibilizados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 191-197, 2007.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by Nontuberculous Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 177-215, 1996.

FIFIS, T.; PLACKETT, P.; CORNER, L. A.; WOOD, P. R. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 29, p. 91-101, 1989.

GONÇALVES, G. R.; PALMEIRA, E. M. "Suinocultura Brasileira" en **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, n. 71, 2006. Disponível em: < <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br> >. Acesso em: 13 mai. 2011.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotics aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 138-151, 1994.

GRAPHPAD SOFTWARE. **INSTAT guide**: [www. Graphpad.com](http://www.graphpad.com). Cary: Graphpad Software, 1998.

HAAGSMA, J. Bovine tuberculosis. **Office International des Épizooties** (Manual Amendment, 2), 11 p., 1998.

HAUPTLI, L.; LOVATTO, P. A.; SILVA, J. H. S.; GARCIA, G. G.; BRUM JÚNIOR, B. S.; OLIVEIRA, J. L. S. Níveis de soro de leite integral na dieta de leitões na creche. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1161-1165, 2005.

HORSBURGH, C. R. *M. avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 324, p.1332, 1991.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Nacional**. Rio de janeiro: IBGE, v. 35, 2007.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. 777p.

INDERLIED, C. D. Microbiology and minimum inhibitory concentration testing for mycobacterium avium complex prophylaxis. **American Journal of Medicine**, v. 102, p. 2-10, 1997.

JANETSCHKE, P. Über die tuberkolose beim schwein. **Monatshefte Veterinaermedizin**, n. 18, 1963, 800 p.

JUBB, V. F.; KENNEDY, P. C. **Pathology of domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1993. 747 p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-4, p. 5-14, 1994.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; IONDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR. W. C. **Diagnóstico Microbiológico – texto a atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Meds, 2001.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C.; BERGEYS. **Manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willian & wilkins, 1994.

LANGENEGGER, C. H.; MENKE, L. G.; LANGENEGGER, J. Micobactérias isoladas de lesões tuberculóides de linfonodos cervicais de suínos do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v. 8, p. 53-59, 1973.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J. Linfadenites cervicais tuberculosas e pseudotuberculosas em suínos de abate de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v. 9, p. 33-40, 1974.

LANGENEGGER, C. H.; LEITE, R. C.; LANGENEGGER, J.; RIBERAL, L. A. Linfadenites tuberculóides em suínos de abate na região de Brasília. **Pesq. Agropec. Brasileira, Série Veterinária**, v. 10, p. 61 – 64, 1975.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J. Prevalência e distribuição dos sorotipos de micobactérias do complexo MAIS isolado de suínos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 1, n. 3, p. 75 – 80, 1981.

LILENBAUM, W. O uso do Elisa para o diagnóstico da tuberculose bovina no Brasil: uma possibilidade interessante? **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 28-31, 1999.

LILENBAUM, W.; PESSOLANI, M. C. V.; FONSECA, L. S. The use of ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, p. 161-166, 2001.

LILENBAUM, W.; SAAD, M. H. F.; SANTOS, O. M.; SILVA, M. G.; SOBRAL, L. F.;

FONSECA, L. S. Ocorrência de micobactérias em suínos de abate clandestino no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista brasileira de ciências Veterinárias**, v. 9, n. 2, p. 93- 96, 2002.

LIMA, J. A. F.; OLIVEIRA A. I. G.; FIALHO, E. T. **Produção de suínos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 199 p.

MAQUEDA, J. J. **Curso para capacitação em produção e sanidade suína**. Campinas: Consuiter, 1999. 24 p.

MARASSI, C. D.; ALMEIDA, C. A. S.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; LILENBAUM, W. The use of ELISA for the diagnosis of goat tuberculosis in Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 8, p. 937-943, 2009.

MARTINS, L. S.; LEÃO, S. C.; MORÉS, N.; SANTIAGO, V. S.; DUTRA, V.; PINHEIRO, S. R.; BALLIAN, S.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologia e controle das micobacterioses do sul do Brasil – Estimativa do impacto econômico (resultados preliminares). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, V.9, 1999, Belo Horizonte, MG. **Anais**. Belo Horizonte. 1999. 217 p.

MARTINS, L. S. **Epidemiologia e controle das micobacterioses em suínos no sul do Brasil: estimativa do impacto econômico e estudo da sazonalidade**. 2001. 51p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MCNAIR, J.; CORBETT, D. M.; GIRVIN, R. M.; MACKIE, D. P.; POLLOCK, J. M. Characterization of the Early Antibody Response in Bovine Tuberculosis: MPB 83 is an Early Target with Diagnostic Potential. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53, p. 365-371, 2001.

MOHAMED, A. M.; GHADA, A. A. E.; ESSAM, A. N. Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous Mycobacterium species from slaughtered pigs in Egypt. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 48-52, 2009.

MORÉS, N.; AMARAL, A. L.; VENTURA, L.; SILVA, R. A. M.; SILVA, V. S.; BARIONI JUNIOR, W. Comparação entre métodos de tuberculinização no diagnóstico da infecção por

agentes do complexo *Mycobacterium avium* ou *M. bovis* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 5, p. 1- 9, 2006.

MORÉS, N.; VENTURA, L.; DUTRA, V.; SILVA, V.S.; BARIONI, Jr W.; OLIVEIRA, S.R.; KRAMER, B.; FERREIRA, J. S. Linfadenite granulomatosa em suínos: linfonodos afetados e diagnóstico patológico da infecção causada por agentes do Complexo *Mycobacterium avium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 13-17, 2007.

MORÉS, N. **Linfadenite granulomatosa em suínos causada por micobactérias atípicas**. Embrapa Suínos e Aves. Disponível em: <HTTP:// www.cnpsa.embrapa.br/artigos>. Acesso em: 20 de jul. 2010a.

MORÉS, N. **Diagnostico da infecção por mycobacterium do complexo avium em rebanhos suínos**. Embrapa Suínos e Aves. Disponível em: <HTTP:// www.cnpsa.embrapa.br/artigos>. Acesso em: 1 ago. 2010b.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 111-124, 1994.

MOTA, P. M. P. C.; LANGENEGGER, C. H.; LEITE, R. C.; LANGENEGGER, J. Micobactérias isoladas de suínos do Estado de Minas Gerais. **Revista de Microbiologia**. (São Paulo), v. 11, n. 1, p. 29-33, 1980.

MUSCOPLATE, C. C.; THOEN, C. O.; CHEN, A. C. Development of specific lymphocyte immunostimulation and tuberculin reactivity tuberculin skin reactivity in swine infected with mycobacterium bovis and mycobacterium avium. **American Journal Vetereinary Research**, v. 36, p. 1167-1171, 1975.

OLIVEIRA, S. J.; CHEONG, F.; GIANOULAKIS, M. K.; STEPAN, A. L.; FALLAVENA, L. C. B. Teste de Elisa e intradérmico para diagnóstico de infecção por micobactéria e *Rhodococcus equi*, em suínos infectados experimentalmente. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, n. 3, p. 249- 257, 1996.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE LA SALUD. **Primer seminário internacional sobre tuberculosis bovina para lãs Américas**. Santiago: OMS1970. 262 p. (Publicação Científica, 258).

PEDLEY, S.; BARTRAM, J.; REES, G.; DUFOUR, A.; COTRUVO, J. A. Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and ,management. **Emerging issues in water and infectious diseases**, IWA publishing 237p. 2004.

PLACKET, P. ; RIPPER, J.; CORNER.; L. A.; SMALL.; K. DE WITTE, K.; MELVILLE, L.; HIDES.; S WOOD, P. R. An Elisa for the detection of anergic tuberculous cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, n. 1, p. 15-19, 1989.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 357-339, 1988.

RAY, J. A.; MALLMANN, V. H.; MALLMANN, W. L.; MORRILL, C. C. Pathologic and bacteriologic features and hypersensitivity of pigs given *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* or Group III mycobacteria. **American Journal Veterinary Research**, v. 33, n. 7, p. 1333-1345, 1972.

REIS, R. Controle da tuberculose em alguns países. **Arquivos da escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 17, p. 45-56, 1965.

RITACCO, V.; DE KANTOR, I.; BARREIRA, L.; NADER, A.; BERNADELLI, A.; TORREA, G.; ERRICO, F, FLIESS, E. Assessment of the sensitivity and specificity of Elisa for detection of Mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 34, p. 119 – 125, 1987.

RITACCO, V.; BARRERA, L.; DE KANTOR, I. N. Utilidad Del enzima inmunoensayo em el diagnóstico de La tuberculosis. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, V. 110, p. 461-470, 1990.

ROCHA, D. C. C. **Suinocultura: exportação de carne suína sob 2,7% em junho.** Zootecnia Brasil, Montes Claros, 2008. Disponível em: <http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?storyid=1730> acesso em: 29 abr. 2011.

ROXO, E.; VASCONCELLOS, S. A.; PINHEIRO, S. R.; BARUSELLI, P. S.; MACRUZ, R. LEITE, C. Q. L. Evaluation of tuberculin skin reaction in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, n.1, p. 81-92, 1998.

SALAZAR, F. H. P. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil.** 2005. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade federal de mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Mato Grosso, 2005.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SATO, D. N.; SILVA, E. A. M.; PALACI, M.; UEKI, S. Y. M.; TELLES, M. A. S.; MARTINS, M. C.; LEITE, O. H. M. Susceptibilidade in vitro de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à ciprofloxacina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia (México)**, México, v. 32, n. 4, p. 249-253, 1990.

SILVA, V. S.; MORÉS, N.; DUTRA, V. D.; FERREIRA NETO, J. S.; SAAD, M. H. F. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, n. 6, p. 1-10, 2000.

SILVA, V. S.; MORÉS, N.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; BALIAN, S.; DUTRA, V.; LEÃO, S. C.; PINHEIRO, S. R.; SAKAMOTO, S. M.; FERREIRA NETO J. S. Identificação dos fatores de risco associados à ocorrência de micobacterioses no Sul do Brasil, estudo caso-controle. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 19-22, 2001.

SILVA, P. E. G.; PINHEIRO, S. R.; LEALL, M. L. R.; BERTAGNON, H. G.; MOTTA, P. M. P. C.; SINHORINI, I. L.; VASCONCELLOS, S. A.; BENESIL, F. J. Teste de tuberculinização em caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 880-886, 2006.

SILVEIRA, P. **Tecnologia:** carne suína “made in Brasil” tem a melhor qualidade e baixo custo de produção, 2009. Disponível em: <http://www.portaldogronegocio.com.br/conteudo.php?id=10802> Acesso em: 14 maio 2011.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Goat Medicine**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1994. 620 p.

SOBESTIANSKY, J.; COSTA, O. A. D.; MORÉS, N.; BARIONI, W.; PIFFER, I. A.; GUZZO, R.; SILVA, V. S.; VENTURA, L. V. **Linfadenite granulomatosa em suínos causada por micobactérias atípicas**. Concórdia - Santa Catarina, Embrapa Suínos e Aves, 2001. P. 1-6. (Comunicado Técnico, 287).

SONGER, J. G.; BICKNELL, E. J.; THOEN, C. O. Epidemiological investigation of swine tuberculosis in Arizona. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 44, p. 115-120, 1980.

TAMMEMAGI, L.; SIMMONS, G. C. Pathogenicity of *Mycobacterium intracellulare* to pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, p. 337-339, 1971.

THOEN, C. O. Enzyme- Linked Immunosorbent Assay for detecting antibodies in Swine infected with *Mycobacterium avium*. **Australian Journal Veterinary Research**. v. 40, n. 8, p. 1096-1099, 1979.

THOEN, C. O.; KARLSON, A. G. Tuberculosis. In: DUNNE, H. W.; LEMAN, A. D.; STROW, B.; GLOCK, R. D.; MENGELING, W. L.; PENNY, R. H. C.; SCHOLL, E. **Diseases of swine**. 6 Ed. Ames, USA: Iowa State University Press, 1986, p. 712-729.

THOEN, C. O. Tuberculosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 9, p. 1045-1048, 1988.

THOEN, C. O. Tuberculosis. In: Leman A. D.; STRAW B. E.; MENGELING, W. L.; DALLAIRE S TAYLOR, D. J. (Ed.). **Diseases of swine**. Ames: Iowa State University Press, 1992, p. 617-626.

THOREL, M. F.; HUCHZERMEYER, H.; WEISS, R.; FONTAINE, J.J. *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. **Veterinary Research**, v. 28, p. 439-447, 1997.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology**. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. 482 p.

VASCONCELLOS, S. A. Epidemiologia da tuberculose. **Comunicação científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 3, n. 1/2, p. 81-89, 1979.

YACHIDA, S.; SHIMIZU, K. Studies on atypical mycobacteria isolated from tuberculosis lesions of the mesenteric lymph nodes of slaughtered pig. **Japanese Journal Veterinary Science**, v. 35, n. 6, p. 459 - 471, 1973.

WANG, Y.; WHITTALL, T.; MCGOWAN, E.; YOUNSON, J.; KELLY, C. BERGNEIER, L. A.; SINGH, M.; LEHNER, T. Identification on of stimulating and inhibitory epitopes within the heat shock protein 70 molecule that modulate cytokine production and maturation of dendritic cells. **Journal Immunology**, v. 174, p. 3306-3316, 2005.

WILKER, B. M.; BATISTA, C. A. M.; LIMA, H. A.; LEITE, G. F.; PAULA, J. F.; PORTO, W. B.; KIM, M. P.; JUNIOR, C. M. Tuberculose intestinal como causa de obstrução intestinal: Relato de caso e revisão de literatura. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 29, n. 4, p. 489 -492, 2009.

WISSELINK, H. J.; SOLT-SMITS, C. B. V.; OORBURG, D.; SOOLINGEN, D. V.; OVERDUIN, P.; MANESCHIJN-BONSING, J.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BUYS-BERGEN, H.; ENGEL, B.; URLINGS, B. A. P.; THOLE, J. E. R. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 401-407, 2010.

WOLINSKY, E. Nontuberculous micobactéria and associated diseases. **American Review of Respiratory Disease**, v. 119, p. 107-159, 1979.

WOOD, P. R.; CORNER, L. A.; ROTHEL, J. S.; RIPPER, J. L.; FIFIS, T.; MCCORNICK, B. S.; FRANCIS, B.; MELVILLE, L.; SMALL, K.; De WITTE, K.; TOLSON, J.; RYAN, T. J.; LISLE, G. W.; COX, J. C.; JONES, S. L. Afield evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 31, p. 71-79, 1992.

WILLIAMS, R. S.; HOY, W. A. The viability of *B. tuberculosis* (bovinus) on pasture land, in stored feaces and in liquid manure. **Journal of Hygiene**, n. 30, p. 413 – 419, 1930.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonótica diseases**. Geneva: WHO/VPH, 1984, 49 p.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999.

ANEXO A

FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL