CARLOS AUGUSTO SCACCHETTI DE ALMEIDA

Avaliação do Teste Cervical Comparativo no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos (*Capra hircus*)

Dissertação 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 a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Sônia Regina Pinheiro

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2105
FMVZ

Almeida, Carlos Augusto Scacchetti de
Avaliação do Teste Cervical Comparativo no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos (*Capra hircus*) / Carlos Augusto Scacchetti de Almeida. – São Paulo : C. A. S. Almeida, 2009.
88 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Sônia Regina Pinheiro.

1. Tuberculose. 2. Caprinos. 3. Diagnóstico. 4. Tuberculina. I. Título.

ERRATA

Folha

Tabela

Linhas

68

4

9 às 16 (excluí-las)

Folha

Apêndice

Linhas

88

21 à 29 (excluí-las)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do teste cervical comparativo no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos (*Capra hircus*)", protocolado sob o nº994/2006, utilizou caprinos (*Capra hircus*), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Sônia Regina Pinheiro, 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 ad referendum".

We certify that the Research "Evaluation of the cervical comparative test in the diagnosis imunoalérgico of the tuberculosis in caprine (*Capra hircus*)", protocol number 994/2006, under the responsibility Profa. Dra. Sônia Regina Pinheiro, 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 11/02/09.

São Paulo, 12 de janeiro de 2009

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALMEIDA, Carlos Augusto Scacchetti

Título: Avaliação do Teste Cervical Comparativo no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos (*Capra hircus*)

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Ana Maria e Alfredo, e ao meu irmão, Celso Henrique.

“... há situações que constituem a nossa prova aflitiva e áspera, mas redentora e santificante...”

Bezerra de Menezes

Agradecimentos:

À Deus, acima de tudo, por me conceder a oportunidade de continuar a caminhada nos estudos;

À minha família, que continua me fornecendo suporte para a concretização dos compromissos que assumo;

Aos colegas e amigos do curso de pós-graduação que compartilham as ansiedades e ajudam moralmente, a cada dia, nas situações mais difíceis de se enfrentar;

À professora doutora Sônia Regina Pinheiro, por ter me dado a oportunidade de abraçar essa linha de pesquisa e por depositar em mim a confiança na execução deste trabalho;

Ao professor doutor Sílvio Arruda Vasconcellos, que, de forma indireta, sempre forneceu amparo e demonstrou preocupação em todas as etapas da pesquisa;

À doutora Eliana Roxo - do Instituto Biológico de São Paulo - que muito me ensinou sobre a prática laboratorial em tuberculose.

Aos docentes do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sobretudo os doutores Fernando José Benesi e Eduardo Harry Birgel Junior, que confiaram ao grupo dessa pesquisa todo o suporte diagnóstico da tuberculose animal, abrindo as portas para o estabelecimento da parceria;

Ao professor Dr. Paulo César Maiorka, e ao seu orientado, Caio Rodrigues dos Santos, do Departamento de Patologia da mesma universidade, pela paciência em agüentar as nossas pressas na finalização do experimento;

Às Médicas Veterinárias residentes do Hospital de Ruminantes da FMVZ-USP, Laura Cristina Sant'Anna Henriques, Juliana Silva Nogueira e Camila Freitas Batista, bem como aos pós-graduandos, por todo o bom humor e espírito de equipe que foram capazes de manter conosco;

À doutora Josir Laine Aparecida Veschi, Médica Veterinária responsável pelo setor de Sanidade Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Semi-árido, pela recepção e amparo durante os trabalhos à campo em Pernambuco (PE);

Ao professor Sérgio Santos Azevedo, da Universidade Federal de Campina Grande (PB), pela ajuda na estatística desta dissertação e pela concessão de amostras para os grupos experimentais da pesquisa;

Às técnicas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, Zenaide Maria de Moraes Higa e Gisele Oliveira de Souza, pelo coleguismo no laboratório;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudos de mestrado;

À todas as demais pessoas que colaboraram, cada uma à sua maneira, para a realização deste estudo,...

... meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

ALMEIDA, C. A. S. Avaliação do Teste Cervical Comparativo no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos (*Capra hircus*) [Evaluation of Comparative Cervical Test in the imunoallergic diagnosis of the tuberculosis in goats (*Capra hircus*)]. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O crescimento da caprinocultura no Brasil e a necessidade de controle sanitário dessas criações justificam o estudo de avaliação do teste tuberculínico na espécie caprina. Utilizando os parâmetros de Silva et al. (2006) foram avaliados 600 caprinos procedentes dos Estados de Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Paraíba e São Paulo. Baseados nos valores do Teste Cervical Comparativo (TCC) 60 animais foram selecionados e submetidos a exame clínico, eutanásia e colheita de material para exames microbiológicos, histopatológicos e moleculares. Dos 36 caprinos positivos, 27 (72%) resultaram em isolamento de micobactérias tipificadas como sendo do complexo *M. tuberculosis*. Foram identificados focos de tuberculose em caprinos nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraíba. Além do isolamento de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, foram identificados em alguns animais outras bactérias como *M. kansasii*, *M. flavescens*, *M. avium*, complexo *M. florentinum* – *M. lentiflavum* – *M. simiae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *C. bovis*. Em um caso houve o isolamento de *C. bovis* concomitante com micobactéria do complexo *M. tuberculosis*. As lesões macroscópicas e histopatológicas não diferenciaram a infecção provocada por *C. bovis* ou por micobactéria do complexo *M. tuberculosis*. Os resultados bacteriológicos, histopatológicos e de identificação genética validam a utilização do padrão de interpretação de Silva et al. (2006) no TCC para o diagnóstico da tuberculose em caprinos.

Palavras-chave: Tuberculose, Caprinos, Diagnóstico, Tuberculina

ABSTRACT

ALMEIDA, C. A. S. Evaluation of Comparative Cervical Test in the imunoallergic diagnosis of the tuberculosis in goats (*Capra hircus*). [Avaliação do Teste Cervical Comparativo no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos (*Capra hircus*)]. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The development of farming goats in Brazil, and the need of sanitary control of these flocks, justify the study of tuberculin test evaluation in goats. Using cut-off points established by Silva et al. (2006), 600 goats from Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Paraíba and São Paulo states were evaluated. According to Comparative Cervical Test values, 60 goats were selected, and submitted to clinical exams, euthanized and materials collected for microbiological, histopathological and genetic typing. Out of the 36 positive goats, 27 (72%) had isolation of micobacteria classified like *Mycobacterium tuberculosis* complex. Focus of tuberculosis were identified in São Paulo, Minas Gerais and Paraíba states. Besides isolation of the *M. tuberculosis* complex micobacteria, other bacterias like *M. kansasii*, *M. flavescens*, *M. avium*, *M. florentinum* – *lentiflavum* – *simiae* complex, *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *C. bovis* were identified in some animals. In one case, isolation of *C. bovis* occurred together with micobacteria of the *M. tuberculosis* complex. The macroscopic and histopathological lesions did not discriminate infection for *C. bovis* or of the *M. tuberculosis* complex micobacteria. The bacteriological, histopathological and genetic typing results validate the use of cut-off points established by Silva et al. (2006), in the Cervical Comparative Test for diagnosis of tuberculosis in goats.

Key words: Tuberculosis, Goats, Diagnosis, Tuberculin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Tricotomia para realização do TCC em caprino de Petrolina (PE).....	28
Figura 2 – Mensuração da espessura da pele com cutímetro feita em caprino de Petrolina (PE).....	28
Figura 3 – Aplicação intradérmica de tuberculina em caprino de Ibiúna (SP).....	29
Figura 4 – Exame clínico em caprino de Petrolina (PE) com linfadenite.....	30
Figura 5 – Exame clínico em caprino de Petrolina (PE).....	31
Figura 6 – Médicas Veterinárias em procedimento de eutanásia de caprino de São Paulo (SP) positivo ao TCC.....	32
Figura 7 – Necropsia de caprino em Bueno Brandão (MG), mostrando lesão nodular localizada em pulmão.....	33
Figura 8 – Necropsia de caprino em Bueno Brandão (MG), mostrando lesão nodular em glândula mamárea (na extremidade da faca).....	33
Figura 9 – Corte sagital de linfonodo mediastínico de caprino de Bueno Brandão (MG), mostrando lesões nodulares de aspecto caseoso.....	35
Figura 10 – Processamento laboratorial de material biológico de caprino para isolamento de micobactérias, seguindo-se critérios de biossegurança.....	37
Figura 11 – Reação imunoalérgica em caprino aferida com cutímetro.....	40
Figura 12 – Detalhe de uma reação alérgica cutânea em caprino, mostrando início de necrose no ponto de inoculação de PPD bovina.....	41
Figura 13 – Isolamento de colônias de micobactérias em meio de Stonebrink a partir de inóculo proveniente de pulmão de caprino positivo ao TCC.....	53
Figura 14 – Crescimento em corda de colônias de micobactérias em meio de Stonebrink a partir de inóculo proveniente de linfonodo mediastínico de caprino positivo ao TCC.....	54
Figura 15 – Histopatologia de linfonodo de caprino mostrando granuloma com área central de necrose e intenso infiltrado de células ao redor.....	63
Figura 16 – Histopatologia de linfonodo de caprino mostrando granuloma com área central de necrose e intenso infiltrado de células ao redor.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Interpretação do Teste Cervical Comparativo em caprinos segundo os parâmetros estabelecidos por Silva et al. (2006).....	29
Quadro 2 – Parâmetros clínicos considerados normais em caprinos, segundo Feitosa (2004).....	31
Quadro 3 – Resultados bacteriológicos para isolamento de <i>Corynebacterium spp</i> , segundo material coletado, o animal, e o resultado do Teste Cervical Comparativo (SILVA et al., 2006).....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados dos exames clínicos dos caprinos, segundo o animal, estado de procedência, e teste tuberculínico.....	43
Tabela 2 – Resultados de isolamentos de micobactérias e respectivos tempos de crescimento segundo o animal, procedência, resultado do Teste Cervical Comparativo (TCC) e materiais processados.....	50
Tabela 3 – Resultados bacteriológicos e histopatológicos de caprinos segundo a identificação, procedência, resultado do Teste Cervical Comparativo (SILVA et al., 2006) e natureza do material processado.....	55
Tabela 4 – Resultados de isolamento de micobactérias com respectivos tempos de crescimento segundo a identificação do animal, procedência, valores do Teste Cervical Comparativo, meios de cultura e identificação genética.....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ANIMAIS	26
4.2	TUBERCULINAS	26
4.3	MEIOS DE CULTURA	26
4.4	TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS	27
4.4.1	Tuberculinização	27
4.4.2	Exame clínico dos animais	30
4.4.3	Eutanásia, necropsia e colheita de materiais	31
4.4.4	Exames microbiológicos	34
4.4.5	Exames histopatológicos	37
4.4.6	Identificação de micobactérias	37
4.4.6.1	Obtenção do DNA	38
4.4.6.2	PCR – <i>Restriction Enzyme Pattern Analysis</i> (PRA)	38
4.4.7	Análise estatística	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES	74
7	REFERÊNCIAS	75
8	APÊNDICE	87

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença transmissível de grande importância em saúde pública (ABRAHÃO, 1999) e animal, pois determina um quadro de enfermidade crônica de extrema gravidade no homem, e acarreta acentuadas perdas econômicas, devido à diminuição da produtividade dos rebanhos afetados (RADOSTITS et al., 2002 ACHA; SZYFRES, 2003).

O *Mycobacterium bovis*, que é o principal agente causador de tuberculose nos bovinos, não forma esporos, mas tem moderada resistência ao calor, à dessecação e aos desinfetantes, porém é facilmente destruído pela luz solar direta, tendo maior resistência em ambientes úmidos (RADOSTITS et al., 2002).

Outras espécies de micobactérias – exceto aqueles pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* – normalmente são agentes oportunistas de infecções em animais de produção, que nesses casos são referidas como micobacterioses. São exemplos o *Mycobacterium flavescens*, *M. kansasii* (VASCONCELLOS, 1979; KRIEG; HOLT, 1994).

O *Mycobacterium flavescens* é uma micobactéria classificada fenotipicamente como do grupo II de Runyon (escotocromogênica), produz pigmentos amarelo-alaranjados intensos, podendo ser confundido com *M. gordonae*. O *Mycobacterium kansasii* pertence ao grupo I de Runyon (fotocromogênica), e as colônias podem apresentar aspecto de cordões serpentiniformes, à semelhança das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (KONEMAN et al., 2001).

O *Mycobacterium avium* pertence ao grupo III de Runyon (não-fotocromógena) e é responsável por respostas inespecíficas no diagnóstico da tuberculose em bovinos, além de graves infecções em aves domésticas, silvestres e suínos (THOREL et al., 1997; KONEMAN et al., 2001; ACHA; SZYFRES, 2003).

Muitas espécies de mamíferos são suscetíveis aos agentes da tuberculose. A tuberculose bovina é a mais importante do ponto de vista econômico e como zoonose. Nesta espécie as perdas econômicas, advindas da infecção por *Mycobacterium bovis*, podem manifestar-se pela redução de 10 a 20% da produção de leite e do ganho de peso, pela infertilidade e condenação de carcaças. Estima-se que os animais infectados perdem de 10% a 25% de sua eficiência reprodutiva (LILENBAUM, 2000).

Embora no passado a tuberculose no homem provocada pelo *M. bovis* tenha sido epidemiologicamente importante, a adoção de medidas sanitárias quanto aos produtos provenientes de animais tuberculosos (principalmente o leite e a carne) fizeram com que a incidência da doença por esse agente diminuísse significativamente.

O maior rigor na inspeção das carcaças em abatedouros, a pasteurização do leite e a identificação e eliminação dos animais doentes e/ou positivos pelos testes intradérmicos foram os principais responsáveis por esse declínio observado principalmente nos países desenvolvidos (COSIVI et al., 1998). A tuberculose bovina vem sendo alvo de intensas campanhas de erradicação e controle em vários países do mundo desde as décadas de 50 e 60 (LILENBAUM, 2000).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA, 2001) lançou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) que surgiu com o objetivo de melhorar a eficácia das medidas de combate à brucelose e a tuberculose, visando promover a qualidade dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor e contribuir para modernizar as cadeias produtivas do leite e da carne.

O programa tem por objetivo diminuir a prevalência e a incidência de novos casos de brucelose e tuberculose em bovinos e bubalinos, mas não contempla outras espécies economicamente importantes e que podem contrair a tuberculose.

Tradicionalmente tem sido considerado que os caprinos raramente contraem a tuberculose em condições naturais, sendo muito escassos os trabalhos sobre a enfermidade adquirida naturalmente (SOLIMAN et al., 1953). Luke (1958) considera que na crença popular os caprinos são naturalmente resistentes à tuberculose. Lesslie et al. (1960) e Kakkar et al. (1977) também destacaram que a tuberculose naturalmente adquirida era rara nos caprinos.

Entretanto, Jubb e Kennedy (1985) relataram que ovinos e caprinos não apresentavam nenhuma resistência ao bacilo, exceto, possivelmente, ao tipo humano. Todas as espécies e faixas etárias são suscetíveis ao *M. bovis*, sendo os bovinos, caprinos e suínos, os de menor resistência, respectivamente. Os caprinos são bastante suscetíveis, e se forem mantidos junto a rebanhos bovinos infectados, a incidência da doença pode atingir 70 % (RADOSTITS et al., 1994).

Milne (1955) relatou um surto de tuberculose em caprinos em Tanganyika, após tuberculinizar o rebanho mediante a constatação de lesões caseosas presentes em uma cabra que veio a óbito por outras causas.

Lesslie e Linzell (1960) destacaram mais dois casos de reatividade ao teste tuberculinico, com isolamento de micobactérias e presença de lesões nodulares em um rebanho caprino.

Perrin et al. (1983) detectaram 29 caprinos positivos ao teste intradérmico com tuberculina bovina que mantinham coabitação com fêmeas bovinas produtoras de leite na França.

Cousins (1993) constatou 19 caprinos reagentes ao teste intradérmico cervical que conviviam com bovinos anteriormente infectados por *M. bovis* na Austrália, tendo isolado o mesmo agente após abate e necropsia.

Acosta et al. (1998), diagnosticando tuberculose em caprinos, em um programa de erradicação do Ministério da Agricultura nas ilhas da Gran Canária em Tenerife, no período de 1990 a 1992, encontraram 28 caprinos positivos, isolando *M. bovis* do material proveniente de 13 animais.

A cabra é o animal doméstico mais difundido pelas diferentes regiões do mundo, divergentes entre si, quanto ao clima, pela topografia e pela fertilidade. Em todo globo terrestre, existem cabras fornecendo alimentos em benefício do homem (CASTRO, 1984). Atualmente, o maior rebanho de caprinos pertence à China, seguido da Índia, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Turquia e Espanha (COUTINHO, 2007).

O Nordeste brasileiro se destaca pelo desenvolvimento da produção de caprinos, apresentando o maior rebanho nacional que, quase em sua totalidade, é criado em sistema extensivo. Grande parte do efetivo de caprinos do Brasil – cerca de 91% - encontra-se nessa região, sobretudo nos Estados da Bahia, Pernambuco e Piauí. O segundo maior efetivo se encontra na região Sul, todavia, esta é possuidora dos melhores rebanhos, do ponto de vista zootécnico e da produtividade leiteira (IBGE, 2007).

No Brasil, o mercado nacional de produtos oriundos da criação de caprinos se encontra em pleno crescimento, e os criadores têm necessitado investir em tecnologia e na sanidade de seus rebanhos.

Por fazer parte de um agronegócio em franca expansão no Brasil, um dos maiores atrativos para o criador de caprinos é a possibilidade de ingressar no setor

utilizando as mesmas pastagens antes colonizadas pela criação de bovinos. Ao se considerar a demanda de criação para o fornecimento de carnes apenas no Estado de São Paulo, há a necessidade de formação de plantel com três milhões de matrizes da espécie caprina. Considerando que o rebanho atual no Brasil é de dez milhões de cabeças, e que no lugar dos bovinos pode-se criar quantidade muito maior de caprinos, nota-se o elevado potencial do setor (COUTINHO, 2007).

A caprinocultura em expansão vem aumentando a produção de alimentos, especialmente o leite e seus derivados. O leite de cabra suporta as necessidades diárias de milhares de habitantes da região nordeste brasileira e é responsável pela redução de índices de desnutrição infantil, devido ao elevado teor de gordura e açúcares, além de valor protéico superior ao leite bovino (RIBEIRO; RIBEIRO, 2001). Outro produto agregado de alto consumo é o queijo de cabra, que para sua fabricação muitas vezes dispensa o processo de pasteurização do leite o que, no caso de algumas doenças, representa risco na veiculação de patógenos, entre eles o bacilo da tuberculose (ANUARIO BRASILEIRO DE CAPRINOS E OVINOS, 2008).

A tuberculose caprina como zoonose tem sido descoberta através de técnicas de biologia molecular em alguns países. Gutiérrez et al. (1997) identificaram na Espanha, através da técnica de *spoligotyping*, o genótipo caprino do *M. bovis* em 83 isolamentos obtidos de humanos dentre 112 pesquisados. Prodingler et al. (2002) encontraram na Áustria quatro isolados de humanos com genótipos compatíveis com *M. bovis*.

Segundo Brasil (2001), não existem dados sobre a tuberculose em ovinos e caprinos no Brasil que justifiquem a implantação de medidas específicas, visando o controle sistemático da doença em pequenos ruminantes. Porém casos de tuberculose têm sido diagnosticados no campo, através de testes imunoalérgicos e suspeitas clínicas.

O quadro clínico da tuberculose nos caprinos não difere muito dos encontrados nos bovinos, sendo, no entanto, menos evidente (CORREA; CORRÊA, 1992). Caracteriza-se por perda de peso com sinais moderados de enfermidade respiratória, que em estágios iniciais acompanha a tosse profunda e produtiva, e em estágios finais predomina a dispnéia (PUGH, 2005).

A linfadenopatia é sinal característico de tuberculose, podendo-se apresentar de forma localizada ou disseminada por todos os sistemas orgânicos, se houver generalização após bacteremia (CORREA; CORRÊA, 1992). Há casos de aumento

de linfonodos do trato digestório que podem resultar em timpanismo pela dificuldade de eliminação de gases, em consequência da compressão esofágica. Também pode haver disfagia, diarreia e presença de estridores na auscultação (RADOSTITS et al., 2002; CORREA; CORREA, 1992; PUGH, 2005).

Radostits et al. (2002) consideram que em rebanhos caprinos acometidos por tuberculose são geralmente encontrados muito mais animais reagentes aos testes imunoalérgicos e com resultados positivos de necropsia do que o esperado em casos clínicos evidentes.

O diagnóstico clínico pode sugerir a ocorrência da doença, mas a confirmação deve ser laboratorial, pois existem enfermidades que acometem as espécies caprina e ovina e que apresentam lesões macroscópicas semelhantes às observadas na tuberculose.

Cordes et al. (1981), em estudo sobre a observação de tuberculose causada por *M. bovis* em ovinos, sugeriram que a baixa incidência de tuberculose nesses ruminantes ocorra devido às falhas de diagnóstico, pois a linfadenite caseosa apresenta lesões macroscópicas semelhantes às da tuberculose. Tendo em vista que a linfadenite tem ampla distribuição no Brasil e acomete os caprinos (LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1991), este fato também poderia estar ocorrendo nessas criações.

Correa e Correa (1992) relataram um caso clínico sugestivo de tuberculose em caprino atendido no Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista (SP), que apresentava linfadenopatia na região pré-escapular, porém não referem o isolamento do agente infeccioso.

Melo et al. (2005) utilizando o teste tuberculínico em caprinos do Estado de Pernambuco, demonstraram a presença de animais reatores que apresentavam, ao abate, lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Os autores ressaltam a importância da confirmação da validade dos padrões de interpretação adotados (SILVA, 2004) por meio do isolamento do bacilo em meios de cultivo.

Benesi et al. (2008) descreveram o caso de uma cabra atendida em 2004 no Hospital de Ruminantes da Faculdade de Medicina e Zootecnia da USP. O animal apresentava emagrecimento progressivo, linfadenopatia e doença respiratória. Do material de necropsia se isolou *M. bovis*, após diagnóstico imunoalérgico utilizando parâmetro de interpretação da espécie bovina.

Pignata et al. (2008) descrevem os primeiros casos de tuberculose em caprinos no nordeste brasileiro, identificando nove animais positivos dentre 1866 testados em 186 propriedades rurais do Estado da Paraíba (PB). Dos três animais necropsiados foi isolado o *M. bovis*.

Trabalhos de identificação de animais positivos ao teste imunoalérgico são importantes, mas a confirmação da doença através do isolamento do agente infeccioso é fundamental.

Como métodos tradicionais de diagnóstico da tuberculose tem-se a visualização direta do bacilo, através da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen e métodos de isolamento da micobactéria em meios especiais como Löwenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie, com baixos teores de glicerol, o qual favorece o crescimento de *M. bovis* (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES, 1988).

Mullahy (1950) comparou o trifosfato sódico concentrado e hidróxido de sódio na recuperação de bacilos ácidos resistentes. Constatou que o primeiro foi melhor, mesmo tratando as amostras por até duas horas, porém o índice de contaminação foi também elevado, em relação ao uso de hidróxido de sódio.

Kudoh e Kudoh (1974) ao compararem a técnica de cultivo de Ogawa, que se baseia no uso de swab imerso em ácido oxálico a 5% na semeadura, com o tratamento de inóculo com hidróxido de sódio a 4%, obtiveram maior sensibilidade pelo primeiro método, com menor taxa de contaminação.

O Centro Panamericano de Zoonoses (1988) recomenda o método de Petroff para a descontaminação e cultivo de amostras biológicas para o isolamento de micobactérias. O método baseia-se na separação de fração equivalente a 2ml do material biológico após maceração, adição de igual volume de hidróxido de sódio a 4%, homogeneização por 15 minutos a uma temperatura de 37°C e neutralização com ácido clorídrico a 1N ou ácido sulfúrico a 8%.

Ratnam et al. (1987) descreveram uma técnica simplificada para o isolamento de micobactérias baseada na descontaminação e concentração do inóculo com hidróxido de sódio associado ao N-acetil-L-cisteína seguido de ressuspensão em tampão de fosfato e semeadura. Constatou que a não adição de tampão ou água na amostra digerida pelo hidróxido de sódio evita o risco de vazamento do inóculo e contaminação cruzada entre amostras diferentes, e não prejudica a sensibilidade do método.

Buijtels e Petit (2005) compararam a associação N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio com o ácido sulfúrico como diferentes protocolos de descontaminação e recuperação de micobactérias em meio líquido indicador. Concluíram que o ácido sulfúrico permitiu maior taxa de isolamento de micobactérias não tuberculosas.

O diagnóstico da tuberculose em caprinos no campo tem sido feito utilizando métodos indiretos com a utilização da tuberculina. Diferentes métodos têm sido estudados quanto à sensibilidade e especificidade diagnósticas em rebanhos supostamente portadores de micobactérias.

Monagham et al. (1994) relatam que o teste da tuberculina em bovinos tem sido realizado há mais de um século. Esse método é baseado na reação de hipersensibilidade tardia tipo IV, mediado por linfócitos T sensibilizados, frente à inoculação de tubérculo proteína obtida de culturas de *M. bovis* e *M. avium*. Animais positivos apresentam sinais de inflamação no local da inoculação. Segundo parâmetros determinados experimentalmente, os animais são considerados positivos, suspeitos ou negativos.

Existem relatos antigos sobre o diagnóstico da tuberculose em caprinos, através da utilização do teste tuberculínico (SOLIMAN et al., 1953; MILNE et al., 1955). Entre as raças caprinas, não ocorrem diferenças de sensibilidade à tuberculina, mas considera-se que estes animais apresentam menor sensibilidade quando comparados com bovinos (WANASINGHE et al., 1973; ARELLANO et al., 1999).

O *M. bovis* tem sido considerado causador de infecção em caprinos, ovinos, suínos, animais de zoológico e de vida selvagem (LUKE, 1958; THOEN, 1988; BERNABÉ et al., 1991; MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994).

Estudos bioquímicos e genéticos têm gerado divergências quanto à classificação taxonômica de micobactérias isoladas em caprinos.

Aranaz et al. (1999), analisando as características bioquímicas e moleculares de micobactérias isoladas de tecidos provenientes de caprinos, concluíram não haver proximidade filogenética destes com o *M. bovis*, sugerindo a inclusão de nova espécie denominada *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae*. Eles atribuíram tal fato à sensibilidade frente à pirazinamida, e ao seqüenciamento do gene *pncA* nestas amostras, revelando polimorfismo genético derivado do *M. tuberculosis*. Ao mesmo tempo, a amplificação do gene *IS6110*, as técnicas de *RFLP* e de

spoligotyping confirmaram não se tratar de espécies pertencentes ao *Complexo Mycobacterium tuberculosis*.

Niemann et al. (2002) não concordaram com esta classificação, sugerindo a consideração de micobactérias isoladas de caprinos como variantes do *M. bovis*, uma vez notória a mutação dos genes *oxyR* e *gyrB* e a ausência da sequência gênica *mtp40*, que são característicos de *M. bovis*.

Pesquisas recentes têm elucidado a origem evolutiva de isolados de micobactérias de caprinos. Por análise da presença ou ausência de regiões gênicas, reconhece-se que estes grupos isolados apresentam ancestral mais antigo do que isolados de *M. bovis*, reforçando a hipótese de parentesco comum ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, razão por que se define atualmente a espécie *Mycobacterium caprae* (ARANAZ et al., 2003).

Outros agentes podem interferir na prova de tuberculina, havendo a necessidade de se avaliar o material obtido frente a outros agentes de doenças. As reações inespecíficas podem ocorrer em animais sensibilizados por *M. paratuberculosis*, *M. avium*, *Nocardia farcinus*, tuberculose cutânea e pelas micobactérias do meio ambiente, fornecendo resultados falso-positivos (MONAGHAM et al., 1994; LILENBAUM, 2000).

Paliwal et al. (1985), avaliando o espectro de resposta imune em caprinos naturalmente infectados com *Mycobacterium johnei* e correlacionando com observações patológicas, observaram maior resposta imunológica em caprinos inoculados experimentalmente. O mesmo autor atribui essa resposta à maior sensibilização do sistema imunológico em infecções recentes.

Liébana et al. (1998) ao avaliar a detecção do imunomodulador interferon gama frente ao teste intradérmico simples, notaram maior sensibilidade do primeiro método reconhecendo um limiar de detecção satisfatório para o diagnóstico de infecções recentes por *M. bovis*, mas com perda de especificidade em co-infecções com *Mycobacterium avium*.

Álvares et al. (2008) estudaram as perdas de sensibilidade das técnicas diagnósticas em ocorrência simultânea de tuberculose e paratuberculose em rebanhos caprinos naturalmente infectados na Espanha. Consideraram que há perda de sensibilidade no teste cervical comparativo (TCC) em casos de infecção mista.

Com o objetivo de diagnosticar a tuberculose em caprinos, causada pela infecção natural por *M. bovis*, Acosta et al. (2000) utilizaram o teste cervical simples (TCS) e verificaram que esse método apresentava uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 65%. Porém, Gutiérrez, Tellechea e Garcia Marin (1998), avaliando testes diagnósticos para a detecção de caprinos infectados por essa espécie de micobactéria, encontraram uma sensibilidade de 83,7% e uma especificidade de 100%, no TCC, o qual é utilizado comumente para diferenciar respostas inespecíficas (MAPA, 2001).

Outro ponto de divergência na literatura consultada está relacionado com os parâmetros de interpretação dos testes imunoalérgicos utilizados para a espécie caprina.

Monaghan et al. (1994) relatam que as diferenças ocorridas nos testes tuberculinicos podem ocorrer por variações inerentes ao método utilizado (local de aplicação, potência e dose da tuberculina injetada) ou ao observador (variações ocorridas entre as várias leituras realizadas).

Essas variações são importantes para a interpretação mais adequada dos testes imunoalérgicos. Thorel e Gaumont (1977) preconizaram como positividade ao TCS valores maiores ou iguais a 4 mm, enquanto Liébana et al. (1998) consideram positivos valores superiores a esse.

A mesma divergência de parâmetros também se observa no TCC, que é utilizado na eliminação de reações inespecíficas e possível confirmação de positividade. Gutiérrez, Tellechea e Garcia Marín (1998) consideraram uma reação positiva quando a resposta ao PPD bovino superasse a aviária em pelo menos 3 milímetros.

Silva et al. (2006), trabalhando com caprinos experimentalmente sensibilizados com *M. avium* (estirpe D4) e *M. bovis* (estirpe AN5), efetuaram provas de tuberculinização com leituras periódicas (0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas pós-inoculação) para determinar os parâmetros de interpretação do teste cervical simples e cervical comparativo, a serem recomendados para esta espécie animal. Concomitantemente outras variáveis foram avaliadas como espessura de pele e parâmetros físicos.

Como parâmetro do TCS, em caprinos, Silva et al. (2006) sugerem: reação positiva quando o aumento da espessura da pele for maior ou igual a 3,9 mm; suspeita ou inconclusiva com medidas entre 1,8 e 3,8 mm e negativa se o aumento

for menor ou igual a 1,7 mm. No teste cervical comparativo consideram: positivo quando a reação à tuberculina bovina superar a aviária em pelo menos 2,5 mm, suspeito ou inconclusivo quando a diferença situar-se no intervalo de 1,9 a 2,4 mm e negativo se a reação à tuberculina bovina superar a aviária em até 1,8 mm.

Os valores padrões recomendados pelo MAPA (2001) para realizar a leitura e interpretação do resultado do teste cervical comparativo, em bovinos e bubalinos, são superiores aos encontrados em caprinos no experimento de Silva et al, (2006). Talvez, esta diferença possa ser explicada porque os bovinos e bubalinos reajam com maiores intensidades aos testes de tuberculinização do que os caprinos, o que também invalida o uso de padrões de interpretação do teste tuberculínico estabelecidos nestes grandes ruminantes para os caprinos.

2 JUSTIFICATIVA

Diante da importância da tuberculose e suas implicações na saúde pública, do incremento da caprinocultura no Estado de São Paulo e outras regiões do País, da constatação de casos de tuberculose em caprinos e da exigüidade de dados disponíveis em literatura, justificou-se a elaboração deste trabalho, cujo propósito foi de: avaliar, a campo, a resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina, no teste cervical comparativo em caprinos, utilizando os parâmetros de interpretação padronizados por Silva et al. (2006). Estes resultados podem dar subsídios aos Médicos Veterinários na orientação das medidas profiláticas (abate ou não) em propriedades rurais que apresentam casos de tuberculose em caprinos de seus rebanhos.

3 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância do tema, a precariedade de dados nacionais sobre a tuberculose em caprinos e a necessidade de aprofundamento nas técnicas de diagnóstico pertinentes, este trabalho teve por objetivos:

- Avaliar a campo a resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina em caprinos, utilizando os parâmetros padronizados por Silva et al. (2006).
- Isolar e tipificar microrganismos presentes em linfonodos e lesões sugestivas de tuberculose.
- Proceder a caracterização biomolecular das cepas isoladas.
- Verificar a correlação entre as bactérias isoladas, os resultados do teste imunoalérgico utilizado (TCC) na triagem e seleção dos animais e os resultados dos exames histopatológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do estudo proposto foram utilizados os materiais abaixo considerados.

4.1 ANIMAIS

Foram submetidos ao Teste Comparativo Cervical (TCC) 600 caprinos provenientes dos Estados de Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Pernambuco (PE), Paraíba (PB) e São Paulo (SP), todos submetidos a diferentes sistemas de exploração zootécnica. Após a tuberculinização, 60 animais foram selecionados segundo o resultado ao TCC para compor três grupos experimentais da pesquisa: 36 animais considerados positivos ao alérgoteste, 2 animais inconclusivos e 22 caprinos considerados negativos. Os animais foram eutanasiados e deles foram coletados materiais para exames microbiológicos, histopatológicos e caracterização biomolecular das cepas isoladas.

4.2 TUBERCULINAS

Foram utilizados derivados de proteína purificada (PPDs), aviária e mamífera, contendo 0,5 mg/mL e 1,0 mg/ml de tubérculo-proteína, respectivamente, todos produzidos pelo Instituto Biológico de São Paulo. As partidas dos frascos de tuberculina mamífera e aviária, respectivamente, foram: 001/07 e 003/07 (Minas Gerais, Pernambuco e Paraíba); 002/06 e 001/06 (Paraná); 004/07 e 003/07 (São Paulo).

4.3 MEIOS DE CULTURA

Para o isolamento de possíveis micobactérias foram utilizados os meios de cultura Stonebrink-Leslie e Löwenstein-Jensen (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988). O meio de Stonebrink foi distribuído em tubos de vidro (18 x 180 mm) com tampa de algodão hidrófobo, em volume de 7 mL por tubo. Para o meio de Löwenstein-Jensen foram empregados tubos de vidro (15 x 160 mm) com tampa de baquelite, no volume de 7 mL por unidade.

Para o isolamento de outras bactérias foram utilizados 3 mL de caldo de infusão cérebro coração (BHI) distribuídos em tubos e 5 mL de ágar sangue (sangue de carneiro a 5%) distribuídos em placas segundo as técnicas desenvolvidas por Murray (1999) e Krieg e Holt (1994).

4.4 TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS

Para a avaliação do TCC nos caprinos, as técnicas e procedimentos abaixo descritos foram sistematicamente realizadas.

4.4.1 Tuberculinização

Após contenção e identificação do animal, os locais de aplicação intradérmica da tuberculina foram demarcados por tricotomia, a uma distância de 10 cm entre si, na região lateral do terço médio da coluna cervical (Figura 1), e a espessura da dobra da pele em cada local foi medida com cutímetro⁵ antes da inoculação (Figura 2). Em seguida, com seringas de insulina descartáveis, tuberculinas aviária e mamífera foram inoculadas (Figura 3) na dosagem de 0,1 mL, sendo a PPD aviária inoculada cranialmente e a PPD bovina caudalmente, sempre de um mesmo lado em todos os animais. Após 72 horas ($\pm$ 6 horas) da inoculação, foram realizadas novas mensurações da espessura da dobra da pele nas áreas de aplicação.

⁵ Hauptner®

Figura 1 – Tricotomia para a realização do TCC em caprino de Petrolina (PE) - São Paulo – 2009

Figura 2 – Mensuração da espessura da pele com cutímetro feita em caprino de Petrolina (PE) - São Paulo – 2009

Figura 3 – Aplicação intradérmica de tuberculina em caprino de Ibiúna (SP). São Paulo – 2009

Os resultados dos testes foram obtidos calculando-se a diferença de aumento das dobras da pele provocadas pelas inoculações das tuberculinas mamífera (Δ PPD Bv) e aviária (Δ PPD Av), no momento da inoculação e 72 horas ($\pm$ 6 horas) após, subtraindo-se Δ PPD Av de Δ PPD Bv. Esses resultados (Δ PPD Bv - Δ PPD Av) foram então interpretados segundo os parâmetros estabelecidos por Silva et al. (2006) (Quadro 1).

Diferenças das medidas (Δ) de espessura de pele frente aos PPDs* bovino e aviário (mm)	Interpretação
$(\Delta \text{ PPD Bv} - \Delta \text{ PPD Av}) \leq 1,8$	Negativo
$1,9 < (\Delta \text{ PPD Bv} - \Delta \text{ PPD Av}) < 2,4$	Inconclusivo
$(\Delta \text{ PPD Bv} - \Delta \text{ PPD Av}) \geq 2,5$	Positivo

PPD: derivado proteico purificado

Quadro 1 – Interpretação do Teste Cervical Comparativo em caprinos segundo os parâmetros estabelecidos por Silva et al. (2006)

4.4.2 Exame clínico dos animais

Antes da composição dos grupos experimentais, os caprinos foram submetidos a exame clínico para se avaliar a ocorrência de possíveis quadros de linfadenite caseosa e verificar correlação entre sinais clínicos observados e ocorrência ou não de tuberculose.

Para tanto, foram inspecionados e palpados os linfonodos submandibulares, pré-escapulares, pré-crurais, inguinais ou supra-mamários (Figura 4). Também foi auscultado todo o trato respiratório nos focos laringo-traqueal, traqueobrônquico e brônquio-bronquiolar de cada animal individualmente. Concomitantemente, outros parâmetros foram avaliados, como a frequência cardíaca e respiratória, a temperatura, os movimentos ruminais. Foram inspecionadas e classificadas também as mucosas e a condição corporal de cada animal. Todos os dados clínicos obtidos foram avaliados segundo referência de semiologia proposta por Feitosa (2004), cujos parâmetros são demonstrados no quadro 2.

Figura 4 – Exame clínico em caprino de Petrolina (PE) com linfadenite - São Paulo - 2009

Figura 5 – Exame clínico em caprino de Petrolina (PE) – São Paulo – 2009

Parâmetro	Intervalo de normalidade
Frequência Cardíaca	95 à 120 b.p.m
Frequência Respiratória	20 à 30 m.p.m
Movimentos Rumenais	6 à 12 a cada 5 minutos
Temperatura Corporal	38,6°C à 40°C

b.p.m: batimentos cardíacos por minuto

m.p.m: movimentos respiratórios por minuto

°C: graus centígrados

Quadro 2: Parâmetros clínicos considerados normais em caprinos, segundo Feitosa (2004)

4.4.3 Eutanásia, necropsia e colheita de materiais

Os animais foram eutanasiados respeitando-se os princípios de abate humanitário (figura 6). Para cada animal, seguiu-se um protocolo de sedação com aplicação de acepromazina⁶ na dose de 0,2 mg/kg, via endovenosa, seguido de tiopental⁷ na dose de 10 mg/kg, por via endovenosa. Procedeu-se a cessação da

⁶ Aceprom 1% (Vetnil®)

⁷ Thiopentax (Cristália®)

função cardio-respiratória através da administração endovenosa de 200 a 300 ml de cloreto de potássio⁸ (KCl).

Os caprinos do Estado de Pernambuco, que compõem o grupo experimental de animais negativos, foram eutanasiados mediante insensibilização prévia por concussão cerebral seguida de rápida sangria, no abatedouro municipal de Petrolina (PE).

Figura 6 – Médicas Veterinárias em procedimento de eutanásia de caprino de São Paulo positivo ao TCC – São Paulo – 2009

Durante a necropsia, os linfonodos submandibulares, mediastínicos e mesentéricos foram retirados independentemente de apresentarem lesões visíveis. Os demais órgãos (pulmões, fígado, baço, glândula mamárea) foram examinados e, na presença de lesões sugestivas de tuberculose, foram fotografados (figuras 7 e 8), colhidos, acondicionados em sacos plásticos do tipo “Ziploc”. Após a identificação foram enviados, sob refrigeração, ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

⁸ Isofarma®

(FMVZ/USP), onde foram mantidos congelados até a realização das análises microbiológicas.

Figura 7 – Necropsia de caprino em Bueno Brandão (MG), mostrando lesão nodular localizada em pulmão – São Paulo – 2009

Figura 8 – Necropsia de caprino em Bueno Brandão (MG), mostrando lesão nodular em glândula mamária (na extremidade da faca) – São Paulo – 2009

Mantendo-se critérios de biossegurança (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004), os materiais foram dissecados com auxílio de tesoura curva e lâmina de bisturi, para a retirada de tecido adiposo aderido aos mesmos. Todos os linfonodos foram seccionados sagitalmente com lâmina de bisturi e as suas metades foram analisadas quanto à presença e intensidade de lesões nodulares.

Reservaram-se, então, parte desses materiais para exame histopatológico, acondicionando-os em frascos coletores universais contendo formaldeído a 10%, na quantidade equivalente a dez vezes o volume do material selecionado. Para os órgãos parenquimatosos (pulmão, fígado etc), realizaram-se cortes, procurando-se garantir uma área com lesão nodular adjacente à outra área de tecido íntegro, a fim de garantir a viabilidade do exame histopatológico.

Todos os tecidos provenientes do grupo experimental de caprinos negativos e inconclusivos ao TCC foram encaminhados para exame histopatológico, ao passo que, dos animais considerados positivos, somente encaminharam-se – a título de confirmação - os tecidos a partir dos quais se obtiveram isolamento de micobactérias nos meios de cultura adotados. Tais exames foram realizados no Departamento de Patologia Animal (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

4.4.4 Exames microbiológicos

No laboratório, todos os órgãos colhidos foram inspecionados. Aqueles que macroscopicamente apresentaram aumento de volume e consistência líquida a pastosa ou aspecto laminar e concêntrico, foram separados para a realização de cultivo microbiológico diferencial de seus conteúdos internos para pesquisa de *Corynebacterium* spp.

Esses linfonodos foram descontaminados exteriormente através de imersão total em solução de álcool etílico a 96% e flambagem, procedimento repetido três vezes. Em seguida foram triturados em Graal estéril com auxílio de areia e solução fisiológica estéreis, para semeadura em caldo de infusão cérebro-coração (BHI) e ágar sangue de carneiro a 5%, que foram mantidos em incubação a 37°C em ambiente de aerobiose por 24 e 72 horas, respectivamente. Inóculos do caldo BHI foram re-semeados em ágar sangue de carneiro a 5% e também mantidos em

incubação por até 72 horas. Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com os critérios de Krieg e Holt (1994) e Murray (1999).

Com o restante dos materiais, procedeu-se a descontaminação e isolamento qualitativo de colônias de micobactérias nos meios de cultura Löwenstein-Jensen e Stonebrink-Leslie, à semelhança do método de descontaminação de Petroff, recomendado pelo Centro Panamericano de Zoonoses (1985).

Inicialmente, cada tecido foi analisado detalhadamente, com o objetivo de selecionar o máximo de lesões nodulares com menor área visível de necrose caseosa. Para linfonodos, as melhores áreas corresponderam às regiões corticais, ao passo que, para órgãos parenquimatosos, corresponderam aos nódulos de menor área, em início de encapsulamento (figura 9).

Figura 9 – Corte sagital de linfonodo medistínico de caprino de Bueno Brandão (MG) mostrando lesões nodulares de aspecto caseoso – São Paulo – 2009

Com auxílio de pistilo, Graal, areia estéril e solução salina a 0,85%, os materiais foram macerados por fricção constante, até se obterem soluções homogêneas que foram filtradas em tubos de Falcon esterilizados. Os filtrados foram centrifugados a 3000 RPM por 15 minutos, e os sobrenadantes formados foram dispensados em Becker contendo solução de hipoclorito de sódio a 5%.

Seguiu-se a primeira ressuspensão dos precipitados em 1,5 ml de solução salina a 0,85% estéril, com auxílio de pipeta Pasteur graduada e estéril, com o que se mediu o volume final. Adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) a 4% em quantidades equivalentes aos volumes ressuspendidos, ou até o dobro deles, na dependência da quantidade de material macerado e da magnitude das lesões caseosas encontradas. Lesões mais necrosadas foram tratadas com menos hidróxido de sódio a 4%, mas com, no mínimo, a quantidade equivalente ao volume ressuspendido. Os tubos de Falcon foram postos em posição horizontal, sofreram agitação lenta e contínua, em temperatura ambiente, durante dez minutos, a fim de que todas as suas superfícies internas fossem descontaminadas. Novamente, as soluções foram centrifugadas a 3000 RPM (rotações por minuto) e o sobrenadante foi dispensado.

Aos precipitados, adicionaram-se três a quatro gotas ou mais, de solução de HCl 1N, contendo 0,004% de indicador vermelho de fenol. Com auxílio de pipetas Pasteur estéreis, ressuspenderam-se os precipitados em um volume de 1,5 ml de solução salina estéril, observando-se a coloração amarelada indicativa da mudança de pH. Uma vez fora da condição de alcalinidade, aferiram-se os valores de pH dos inóculos, com auxílio de fita indicadora (Merck®) até se atingirem os valores de pH final igual a 7,0, correspondente à plena neutralidade dos inóculos.

Os inóculos foram semeados em duplicata nos meios de Löwenstein-Jensen e Stonebrink. Após a semeadura, os tubos de Stonebrink-Leslie tiveram as suas tampas de algodão hidrófobo queimadas ao fogo e rolhas de cortiça foram utilizadas no fechamento dos mesmos, de modo a criar-se um ambiente interno de microaerofilia, favorável ao isolamento de *Mycobacterium bovis*.

Todos os tubos foram mantidos em estufa a 37°C, em posição inclinada, durante no máximo 90 dias, sendo observados semanalmente para se avaliar o tempo de isolamento de colônias de micobactérias, bem como a ocorrência de agentes contaminantes. As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988) e, uma vez confirmada a característica tintorial de álcool-ácido-resistência, foram enviadas para tipificação genética.

Figura 10 – Processamento de material biológico de caprino para isolamento de micobactérias, seguindo-se critérios de biossegurança – São Paulo – 2009

4.4.5 Exames histopatológicos

As amostras foram colocadas em refrigeração (4 a 8°C) durante 24 horas e em seguida foram mantidas à temperatura ambiente até serem submetidas às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Foram utilizadas as técnicas de coloração Hematoxilina-Eosina e Ziehl-Neelsen. Durante as leituras das lâminas, os materiais com presença de granuloma e/ou coloração de Ziehl-Neelsen positiva foram considerados positivos; os que não apresentaram nenhuma alteração histopatológica ou que tenham apresentado apenas necrose, calcificação ou inflamação crônica, foram considerados negativos.

4.4.6 Identificação de micobactérias

Os isolamentos obtidos foram identificados na Seção de Microbiologia - Setor de Micobactérias -, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pelo método de PRA (*PCR-Restriction Enzyme Analysis*).

4.4.6.1 Obtenção do DNA

Uma alçada de colônias de micobactérias foi suspensa em 500 µl água estéril, fervida por dez minutos e congelada a -20°C por pelo menos 18 horas (CHIMARA et al., 2004).

4.4.6.2 PCR - *Restriction Enzyme Pattern Analysis* (PRA)

Esta técnica de identificação por PCR (TELENTI et al., 1993) consiste na amplificação de um fragmento do gene *hsp65*, seguida de digestão com duas enzimas de restrição (*Hae*III e *Bst*EII). As condições utilizadas para a PCR foram: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1,5 mM MgCl₂, glicerol a 10%, 200µM dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador (Tb11: 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT e Tb12: 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT) e 1,25 unidades de Taq polimerase. As reações foram realizadas em tubos de polipropileno de volume final de 50 µL e submetidas a um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por dez minutos, seguido de 45 ciclos de amplificação com um minuto a 95°C, um minuto a 60°C e um minuto a 72°C e um ciclo de extensão final a 72°C por sete minutos.

As reações enzimáticas foram realizadas num volume final de 20µL da seguinte maneira: 2µL de água, 2µL de tampão enzima, 1µL de enzima e 15µL do produto de PCR. No caso das digestões com *Bst*EII a incubação foi efetuada a 60°C por aproximadamente quatro horas e no caso das digestões procedidas com *Hae*III a incubação foi realizada a 37°C por aproximadamente três horas.

As amostras digeridas foram aplicadas em gel de agarose 4%, submetidas à eletroforese com 100 volts por aproximadamente duas horas e visualizadas em aparelho transiluminador, após serem coradas com brometo de etídio. Foram utilizados marcadores moleculares (25bp e 50bp ladder – Gibco/BRL) para o cálculo dos tamanhos das bandas obtidas.

Os padrões de restrição obtidos após digestão foram analisados conforme Devallois et al. (1997) e pelo *site* PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index/html>)

4.4.7 Análise estatística

Para a avaliação do desempenho do Teste Cervical Comparativo (TCC) aplicado nos caprinos, foram determinados sensibilidade, especificidade, e indicador de concordância *Kappa* (PEREIRA, 1995; THRUSFIELD, 1995), frente ao isolamento e caracterização genética pelo método PRA, adotados como padrão-ouro de diagnóstico. Os cálculos foram realizados simulando o uso dos parâmetros de Silva et al. (2006) e os recomendados pelo MAPA. O teste de hipóteses foi conduzido pelo teste de McNemar, com nível de significância de 5% (SIEGEL; CASTELLAN Jr., 2006). O programa utilizado foi o Dag Stat (*Diagnostic and Agreement Statistics*) (MACKINNON, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das medidas de espessura da pele dos 60 caprinos selecionados após a realização do TCC (SILVA et al., 2006) encontram-se no Apêndice. Dos 36 animais que compõem o grupo experimental positivo, sete animais apresentaram valores inferiores a quatro milímetros, valor este considerado limítrofe para a espécie bovina (MAPA, 2001). Os demais componentes do grupo apresentaram valores superiores, sendo considerados positivos aos padrões sugeridos por Silva et al. (2006) para a espécie caprina e pelo padrão bovino do MAPA (2001).

Os animais positivos pertenciam a várias localidades: cinco do Estado de São Paulo (SP), um do Estado da Paraíba (PB) e 30 do Estado de Minas Gerais (MG). Os achados destes animais (figuras 11 e 12) são importantes, pois existem poucos relatos de tuberculose em caprinos, causados por *M. bovis*, no mundo (MILNE, 1955; LESSLIE; LINZELL, 1960; PERRIN et al., 1984; COUSINS, 1993) e no Brasil (CORREA; CORRÊA, 1992; MELO et al., 2005; PIGNATA et al., 2008; BENESI et al., 2008).

Figura 11 – Reação imunoalérgica em caprino aferida com cutímetro – São Paulo – 2009

Figura 12 – Detalhe de uma reação alérgica cutânea em caprino, mostrando início de necrose no ponto de inoculação de PPD bovina – São Paulo – 2009

Os valores de espessuras finais obtidos nos grupos negativo e inconclusivo deste experimento (SILVA et al., 2006) não ultrapassaram a 1,0 mm e 1,8 mm, respectivamente, adequando-se ao que recomenda o padrão bovino (MAPA, 2001) que considera suspeito o animal com valor superior ou igual a 1,9 mm no TCC.

O ponto de divergência está na interpretação de alguns caprinos do grupo positivo que, se fosse adotado o padrão do MAPA (2001), sete animais seriam classificados como inconclusivos. Considerando a ocorrência de isolamento de micobactérias do *Complexo Mycobacterium tuberculosis* em cinco deles (71%), esses caprinos seriam falso-negativos em primeira avaliação ao teste imunoalérgico, permanecendo nos rebanhos como fontes de infecção. Desses caprinos, seis provém do Estado de Minas Gerais (MG) e um de São Paulo (SP).

Esta divergência de interpretação ocorre pela falta de trabalhos que avaliem as respostas nesta espécie animal. Alguns pesquisadores adotaram os mesmos parâmetros utilizados para bovinos (CORDES et al., 1981) ou mesmo valores arbitrários para a sua interpretação (MALONE et al., 2003).

Larsen (1952) ao sensibilizar caprinos com *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium paratuberculosis* e avaliar a espessura da pele após injeção de

alérgenos homólogos, verificou que eles respondem de forma semelhante aos bovinos.

Milne (1955) ao aplicar o TCC em surto de tuberculose ocorrido em Tanganyika, selecionou cinco animais dentre dez reagentes, e a menor espessura final de pele encontrada foi de seis milímetros.

Thorel et al. (1980) demonstraram a possibilidade de diagnosticar rebanhos caprinos tuberculosos através do teste tuberculínico, porém utilizando os mesmos parâmetros de interpretação usados em bovinos.

Acosta et al. (1998), trabalhando em surto de tuberculose, onde se isolaram *M. bovis* de 13 animais, não especifica o teste imunoalérgico utilizado nem o ponto de corte estabelecido para a interpretação dos resultados.

Na leitura de trabalho de testes imunoalérgicos para o diagnóstico da tuberculose, a especificação do teste é importante, entretanto outras variáveis deveriam ser consideradas quando se comparam chaves de interpretação dos mesmos. Na dependência do país e legislação vigente, os antígenos variam em concentração protéica, dose a ser inoculada e tipo de cepa que originará o PPD a ser utilizado. No Brasil o TCS utiliza o PPD mamífero que possui 50.000 UI/mL e a cepa utilizada é o *M. bovis* (cepa AN5); para o TCC também é utilizado o PPD aviário com 25.000 UI/mL de *M. avium* - cepa D4 (LANGENEGGER et al., 1981). Com esta padronização de antígeno é que se recomenda a utilização de 0,1 mL na aplicação do teste (MAPA, 2001).

O valor médio de espessura final da pele, no TCC, para o grupo positivo foi de 9,94mm (Apêndice A). Apesar de haver poucos estudos conduzidos à análise da resposta imunoalérgica cutânea em pequenos ruminantes, é um valor médio próximo aos comumente obtidos em outras espécies de animais de produção.

Roxo (1996), ao padronizar o alérgoteste tuberculínico em búfalos, encontrou espessura final média da pele de 9,82 mm após 72 horas da inoculação de tuberculina, em animais experimentalmente inoculados com *M. bovis* estirpe AN5. Em delineamento experimental com bubalinos naturalmente infectados, encontrou valor médio de espessura final de 10,12 mm, em uma amostragem de 19 animais reagentes ao mesmo.

Mota (2003), ao avaliar a resposta alérgica em bovinos sensibilizados com inóculo de *M. bovis* por via subcutânea e tuberculinizados em vários pontos anatômicos, constatou que a região cervical foi a de maior sensibilidade, obtendo

média máxima de 7,13 mm, dentre 11 fêmeas analisadas. Porém, concluiu que as inoculações de tuberculinas nas regiões escapulares e costal podem ser realizadas sem prejuízo do diagnóstico imunoalérgico.

Corrêa (2008) trabalhando com caprinos determinou que a região de maior reatividade média na tuberculinização corresponde à região anatômica abdominal dorsal esquerda (média de 2,2mm), seguindo-se as regiões torácicas e cervicais. Nesse experimento foi utilizada a dose padrão de 0,1ml (1mg/ml) de tubérculo-proteína, conforme recomenda o MAPA (2001) para os bovinos, em um delineamento experimental com 20 caprinos sensibilizados com *M. bovis* estirpe AN5.

Os dados clínicos obtidos dos 60 caprinos selecionados após a realização do TCC encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados dos exames clínicos de caprinos, segundo o animal, estado de procedência e teste tuberculínico – São Paulo – 2009

(continua)

animal/ Estado	TCC	Temp.	FR	FC	MR	Muc.	Linf.	Auscultação Pulmonar	CC
483(MG)	+	38,0°C	24	84	3	róseas	SMM	NDN	Magra
10(MG)	+	38,9°C	40	140	6	róseas	SMM	Dispnéia mista	Magra
108(MG)	+	38,4°C	20	112	2inc.	pálidas	NDN	Áreas silêncio traqueob., e áreas de discreta creptação	Magra
130(MG)	+	39,7°C	28	140	2inc.	róseas	SMM	NDN	Magra
127(MG)	+	38,8°C	16	108	2inc.	róseas	PCE	Creptação grossa em foco traqueob.	Magra
184(MG)	+	39,0°C	48	124	2inc.	róseas	PCD	NDN	Magra
81(MG)	+	39,0°C	40	100	2inc.	róseas	NDN	NDN	Magra
52(MG)	+	38,1°C	20	100	6	róseas	PCE	NDN	Magra
94(MG)	+	38,8°C	100	80	4	róseas	NDN	NDN	Magra

(continuação)

animal/ Estado	TCC	Temp.	FR	FC	MR	Muc.	Linf.	Auscultação Pulmonar	CC
474(MG)	+	38,4°C	40	132	4	róseas	NDN	Dispneia expiratória	Magra
133(MG)	+	39,2°C	96	100	4	róseas	NDN	NDN	Boa
63(MG)	+	39,0°C	52	100	4	róseas	NDN	NDN	Boa
20(MG)	+	39,1°C	52	100	2	róseas	SMM	NDN	Magra
129(MG)	+	*	52	96	6	róseas	SMM	NDN	Magra
413(MG)	+	39,5°C	80	100	2	róseas	SMM	NDN	Magra
101(MG)	+	39,0°C	104	96	2	róseas	NDN	NDN	Boa
86(MG)	+	39,0°C	76	132	4	róseas	NDN	NDN	Magra
96(MG)	+	39,7°C	120	*	2	róseas	SMM	Hiperpnéia	Boa
39(MG)	+	39,2°C	48	96	6	róseas	SMM	Creptação grossa em foco traqueob.	Magra
163(MG)	-	38,9°C	52	84	4	róseas	NDN	NDN	Boa
22(MG)	+	39,2°C	40	76	4	róseas	SMD; SMM	NDN	Boa
144(MG)	+	39,2°C	32	64	2inc.	róseas	SMM	NDN	Magra
91(MG)	+	39,6°C	56	68	2	róseas	SMD; SMM	NDN	Boa
197(MG)	+	39,1°C	80	84	6	pálidas	SMM	NDN	Boa
114(MG)	+	39,5°C	44	76	4	róseas	NDN	Discreta dispneia inspiratória	Magra
146(MG)	+	39,6°C	116	132	2	róseas	NDN	NDN	Boa
115(MG)	+	39,4°C	32	68	2	róseas	SMM	NDN	Magra
21(MG)	-	*	*	*	*	*	*	*	*
157(MG)	+	*	*	*	*	*	*	*	*
57(MG)	+	*	*	*	*	*	*	*	*
100(MG)	+	*	*	*	*	*	*	*	*
26(MG)	+	*	*	*	*	*	*	*	*
1(PE)	-	38,7°C	12	60	2	róseas	NDN	NDN	Magra
2(PE)	-	40,1°C	24	104	4	róseas	NDN	NDN	Boa
3(PE)	-	38,8°C	12	88	2	róseas	NDN	NDN	Caquexia

(continuação)

animal/ Estado	TCC	Temp.	FR	FC	MR	Muc.	Linf.	Auscultação Pulmonar	CC
4(PE)	-	39,1°C	16	84	2inc.	róseas	PED; PEE	NDN	Magra
5(PE)	-	39,5°C	12	80	0	róseas	NDN	NDN	Magra
6(PE)	-	39,9°C	20	64	2inc.	róseas	PEE	NDN	Magra
7(PE)	-	39,0°C	12	64	2inc.	pálidas	NDN	NDN	Magra
8(PE)	-	40,0°C	16	128	2inc.	róseas	NDN	NDN	Magra
9(PE)	-	39,1°C	16	56	0	róseas	NDN	NDN	Magra
10(PE)	-	39,6°C	16	72	2	róseas	PED	NDN	Magra
11(PE)	-	39,6°C	16	64	2inc.	róseas	NDN	NDN	Caquexia
12(PE)	-	39,4°C	20	120	4	róseas	PED; PEE; IG	NDN	Magra
13(PE)	-	38,7°C	12	88	2	róseas	PED; PCD	NDN	Magra
14(PE)	-	38,4°C	12	108	0	róseas	PED	NDN	Caquexia
15(PE)	-	38,6°C	12	56	2	róseas	PED; PEE	NDN	Magra
16(PE)	-	37,9°C	12	60	0	róseas	SME; PED; PEE; IG	NDN	Caquexia
80/(PR)	-	38,5	20	76	1inc.	Hip.	NDN	NDN	Normal
106/(PR)	-	39,8	28	132	7	róseas	PEE	NDN	Normal
5/(PR)	-	39,6	32	88	5	róseas	PEE	NDN	Normal
81/(PR)	inc.	38,8	28	80	7	róseas	SMD; SMM	NDN	Magra
71/(PB)	inc.	*	*	*	*	*	*	*	*
10/PB	-	*	*	*	*	*	*	*	*
58/PB	+	*	*	*	*	*	*	*	*
1/SP	+	*	*	*	*	*	*	*	*
2/SP	+	*	*	*	*	*	*	*	*
3/SP	+	*	*	*	*	*	*	*	*
4/SP	+	*	*	*	*	*	*	*	*

(conclusão)

animal/ Estado	TCC	Temp.	FR	FC	MR	Muc.	Linf.	Auscultação Pulmonar	CC
5/SP	+	*	*	*	*	*	*	*	*

TCC: Teste Cervical Comparativo

Temp.: temperatura

FR: frequência respiratória

FC: frequência cardíaca

MR: movimentos ruminais

Muc.: mucosas

Linf.: linfonodos (SMD = submandibular direito; SME = submandibular esquerdo; PED = Pré-escapular direito;

PEE = Pré-escapular esquerdo; PCD = Pré-crural direito; PCE = Pré-crural esquerdo; SMM = Supra-mamário;

IG = Inguinais)

CC: condição corporal

NDN: nada digno de nota

m.r.i.: movimentos ruminais incompletos

*: sem avaliação

+: reação positiva

-: reação negativa

inc.: reação inconclusiva

Alguns parâmetros clínicos nos caprinos do Estado de Minas Gerais (MG) revelaram-se alterados como a frequência respiratória, que se mostrou acima dos parâmetros normais, podendo ser consequência do próprio estresse (FEITOSA, 2004) gerado no manejo dos animais durante a execução do exame clínico e ao clima quente da região geográfica.

A temperatura corpórea se manteve próxima ao limite máximo fisiológico para a espécie em alguns animais, fato que pode também estar associado ao clima nas regiões consideradas, e à condição fisiológica de gestação em terço final (ALMEIDA RIBEIRO, 1998) em algumas cabras de Minas Gerais (MG).

A condição corporal de grande parte desses animais estudados não era satisfatória, podendo estar relacionada, além da tuberculose, a restrições alimentares resultantes da baixa qualidade das pastagens, como ocorre em muitos animais criados extensivamente na região nordeste do Brasil, além da baixa suplementação calórica de animais considerados de descarte, como observado nos caprinos de Minas Gerais (MG). Pela mesma razão, os movimentos ruminais dos caprinos deste experimento foram bastante reduzidos. Segundo Feitosa (2004), o número de contrações ruminais depende do tipo de alimento ingerido e do intervalo decorrido entre a última refeição e o exame clínico.

A auscultação do trato respiratório dos animais procedentes de Minas Gerais (MG) revelou algumas alterações nas vias aéreas posteriores como dispnéias, crepitações grossas e redução dos ruídos traqueobrônquicos.

Pugh (2005) revela que quadros de perda de peso associados a sinais moderados de enfermidade respiratória são compatíveis com diagnóstico de tuberculose e que, em estágios iniciais da doença, há tosse crônica, profunda e produtiva, ao passo que, em estágios finais se manifestam a taquipnéia e dispnéia. Essa descrição coincide com a de Radostits et al. (2005) ao constatar que nos rebanhos de caprinos são geralmente encontrados mais animais reagentes aos testes imunoalérgicos com resultados de necropsia sugestivos de tuberculose do que casos clínicos evidentes.

Os relatos de tuberculose em caprinos, existentes na literatura disponível, apresentam dados de exames clínicos efetuados que não são concordantes entre si. Melo et al. (2005) retratam síndromes observadas em caprinos reagentes ao teste tuberculinico, no Estado de Pernambuco, caracterizadas por hipertrofia de linfonodos, abscesso em vestíbulo bucal e ceratoconjuntivite bilateral; os animais eram criados junto a rebanhos com histórico de linfadenite caseosa.

Benesi et al. (2008) descreveram quadro de emagrecimento progressivo, com doença respiratória não responsiva a antibioticoterapia convencional e linfadenopatia submandibular em uma cabra considerada positiva ao teste de tuberculina, frente ao padrão bovino de interpretação, porém com lesões disseminadas à necropsia e posterior isolamento de *M. bovis*.

Pignata et al. (2008), ao descreverem os primeiros casos de tuberculose em caprinos no semi-árido brasileiro, relatam a necropsia de duas cabras que não apresentaram sinais clínicos sugestivos de tuberculose, mas que eram positivas ao TCC no padrão de Silva et al. (2006). A positividade se comprovou com achados de granulomas típicos na histopatologia dos quais foram isolados *M. bovis*.

No grupo experimental positivo houve a discordância entre achados clínicos e positividade nos testes imunoalérgicos à semelhança dos relatos anteriores. Além do teste tuberculinico, é consensual a recomendação de que seja feito o diagnóstico diferencial para outras afecções respiratórias que acometem os caprinos e que podem ser confundidas com tuberculose, dentre elas: pasteurelose, micoplasmoses, pleuropneumonia contagiosa, linfadenite caseosa caprina, artrite-encefalite caprina (CAEV), micobacterioses, pneumovirose, além daquelas de natureza não infecciosa

como verminose pulmonar, lesões faringeanas resultantes de traumas, mesoteliomas e adenocarcinoma (RADOSTITS et al., 2002; PUGH, 2005; SMITH, 2006).

Relatos de tuberculose por outras micobactérias também são pontuais. Anderson e King (1993) referem um caso de isolamento de *Mycobacterium avium* em caprino, com evolução clínica típica de tuberculose e com achados necroscópicos compatíveis.

Acosta et al. (1998), isolaram *Mycobacterium kansasii* de caprino em com lesões granulomatosas e que pertencia a um foco de tuberculose por *M. bovis*.

No presente estudo, a inspeção e a palpação dos linfonodos não sugeriram ocorrência de linfadenite nos animais de Minas Gerais (MG), mas sim em alguns animais de Pernambuco (PE) e Paraná (PR).

A linfadenite caseosa é uma afecção que atinge grandes criações de ovinos e caprinos em diversos países como Austrália, Argentina, Nova Zelândia, África do Sul e Estados Unidos (MERCHANT et al., 1975; AYERS et al., 1977; ASHFAQ; CAMPBELL, 1979; BURREL, 1981). Porém, devido à semelhança das lesões encontradas nos animais acometidos, deve-se fazer diagnóstico diferencial para *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Rodococcus equi*, linfossarcoma e melioidose (PUGH, 2005).

Na região nordeste do Brasil, há uma alta incidência de linfadenite caseosa em caprinos, que determina consideráveis prejuízos às criações animais, como a condenação de carcaças e os danos à pele dos animais infectados (RIBEIRO et al., 1988).

Os resultados das culturas diferenciais para pesquisa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* dos órgãos selecionados no laboratório estão apresentados no quadro 3.

Animal	Resultado TCC	Material coletado	Resultado
483(MG)	POSITIVO	SM	NEGATIVO
108(MG)	POSITIVO	SMM	<i>Corynebacterium bovis</i>
101(MG)	POSITIVO	SMM	Amostra contaminada
146(MG)	POSITIVO	SMM	NEGATIVO
39 (MG)	POSITIVO	SMM	NEGATIVO
63 (MG)	POSITIVO	SMM	NEGATIVO
184(MG)	POSITIVO	MD	NEGATIVO
22(MG)	POSITIVO	MD	NEGATIVO
114(MG)	POSITIVO	MD	NEGATIVO
115(MG)	POSITIVO	MD; MS	NEGATIVO
157(MG)	POSITIVO	MD	NEGATIVO
81 (MG)	POSITIVO	MD	NEGATIVO
91 (MG)	POSITIVO	MS; RF	NEGATIVO
100(MG)	POSITIVO	MS	NEGATIVO
81(PR)	INCONCLUSIVO	SMM; GMD;FIG.	NEGATIVO
5 (PR)	NEGATIVO	FÍGADO	NEGATIVO
106 (PR)	NEGATIVO	MD	<i>C. pseudotuberculosis</i>
14(PE)	NEGATIVO	MD; MS; FIG.	<i>C. pseudotuberculosis</i>

SM: linfonodo submandibular MD: linfonodo mediastínico MS: linfonodo mesentérico RF: linfonodo retrofaríngeo
SMM: linfonodo supra-mamáreo GMD: granuloma no mediastino

Quadro 3- Resultados bacteriológicos para isolamento de *Corynebacterium* spp, segundo material coletado, o animal, e o resultado do Teste Cervical Comparativo (SILVA et al., 2006) – São Paulo – 2009

Dos materiais de 18 animais que apresentaram lesões sugestivas de linfadenite caseosa, dois resultaram em isolamento de *C. pseudotuberculosis*, sendo ambos negativos no TCC e sem isolamento de micobactérias. De um caprino positivo ao TCC foi isolado *Corynebacterium bovis* do linfonodo supra-mamáreo, tendo sido isolado também micobactéria do complexo *Mycobacterium tuberculosis* desse mesmo órgão e do respectivo pulmão.

O *C. bovis* tem sido considerado um importante agente causador de mastites contagiosas em rebanhos bovinos leiteiros, veiculado através da ordenhadeira mecânica ou das mãos do ordenhador, a partir da glândula mamárea infectada (ZANI; COSTA, 2005). Considerando que a cabra da qual se isolou esse agente era proveniente de rebanho de exploração leiteira do Estado de Minas Gerais, esse fato também pode ocorrer em criações de caprinos.

Na literatura pesquisada, não se encontrou relato de co-infecção de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* com *Corynebacterium* sp.

ou com outros patógenos que pudessem interferir na especificidade do TCC em caprinos.

Em setembro de 2008, na Clínica de Ruminantes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, houve um caso de isolamento concomitante de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e micobactéria pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* em uma cabra que veio a óbito durante puerpério; na necropsia foram encontradas extensas lesões nodulares sugestivas de tuberculose⁹.

Em outras espécies de produção há casos de reações inespecíficas em animais sensibilizados por *M. paratuberculosis*, *M. avium*, *Nocardia farcinus* e micobacterioses (MONAGHAN et al., 1994; LILENBAUM, 2000). A utilização de PPD mamífero e aviário permite a distinção entre reações inespecíficas, para-específicas e específicas (SILVA, 2004).

Os resultados dos exames bacteriológicos, para o isolamento de micobactérias a partir dos órgãos coletados, encontram-se nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2- Resultados de isolamentos de micobactérias e respectivos tempos de crescimento segundo o animal, procedência, resultado do Teste Cervical Comparativo (TCC) e materiais processados - São Paulo – 2009

(continua)

animal/ Estado	TCC	SM	MD	MS	RF	SMM	PULM.	FIG.	GM	OUTRO
483/MG	+	N	P/26d	NC	NC	NC	P/26	NC	NC	NC
10/MG	+	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
108/MG	+	NC	NC	N	NC	N	P/12d	NC	P/28d	NC
130/MG	+	N	P/29d	N	NC	NC	P/23d	NC	NC	NC
127/MG	+	P/33d	P/28d	N	NC	NC	P/33d	NC	NC	NC
184/MG	+	N	P/28d	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
81/MG	+	N	P/29d	N	NC	N	P/23d	NC	NC	NC
52/MG	+	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
94/MG	+	N	NC	N	NC	N	NC	NC	NC	NC
474/MG	+	N	N	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
133/MG	+	NC	NC	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC
63/MG	+	N	N	NC	NC	N	P/46d	NC	NC	NC
20/MG	+	N	P/30d	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
129/MG	+	NC	NC	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC
413/MG	+	N	P/46d	N	NC	NC	P/32d	NC	NC	NC
101/MG	+	N	P/34d	P/47d	NC	N	NC	NC	N	NC
86/MG	+	N	NC	N	NC	N	NC	NC	NC	NC

⁹ Comunicação pessoal Prof. Dr. Fernando José Benesi, 2008.

(continuação)

animal/ Estado	TCC	SM	MD	MS	RF	SMM	PULM.	FIG.	GM	OUTRO
96/MG	+	N	P/26d	N	NC	NC	P/39d	NC	NC	NC
39/MG	+	P/17d	P/6d	P/13d	P/39d	N	NC	NC	NC	NC
163/MG	-	N	P/27d	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
22/MG	+	N	P/31d	N	NC	NC	P/25d	NC	NC	NC
144/MG	+	NC	NC	P/30d	N	NC	P/30d	NC	NC	NC
91/MG	+	NC	NC	P/25d	N	N	P/25d	NC	NC	NC
197/MG	+	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
114/MG	+	N	P/23d	N	NC	NC	P/23d	NC	NC	NC
146/MG	+	NC	P/30d	NC	N	N	NC	NC	NC	NC
115/MG	+	NC	P/24d	P/24d	N	NC	NC	P/24d	NC	NC
21/MG	-	NC	NC	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC
157/MG	+	P/80d	P/30d	N	NC	NC	N	NC	NC	NC
57/MG	+	N	NC	N	NC	NC	N	N	N	NC
100/MG	+	P/18d	NC	N	NC	NC	N	NC	NC	NC
26/MG	+	NC	NC	P/25d	N	NC	P/17d	P/25d	N	NC
1/PE	-	P/50d	P/50d	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
2/PE	-	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
3/PE	-	N	N	P/40d	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4/PE	-	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5/PE	-	N	N	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6/PE	-	P/30d.	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
7/PE	-	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
8/PE	-	N	N	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
9/PE	-	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
10/PE	-	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
11/PE	-	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
12/PE	-	N	NC	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
13/PE	-	P/21d	P/21d	P/70d	NC	NC	NC	NC	NC	NC
14/PE	-	N	N	N	NC	NC	NC	N	NC	NC
15/PE	-	P/45d	N	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC
16/PE	-	N	N	P/45d	NC	NC	NC	NC	NC	NC
71/PB	INC	NC	NC	N	NC	NC	N	N	N	P/26d
10/PB	-	NC	NC	N	NC	NC	N	N	NC	N
58/PB	+	N	NC	P/60d	NC	N	P/60d	NC	NC	N
80/PR	-	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	N
106/PR	-	N	N	NC	NC	NC	NC	NC	NC	N
5/PR	-	N	N	N	NC	N	NC	N	NC	NC
81/PR	INC	NC	NC	N	NC	N	NC	N	NC	NC
1/SP	+	N	P/41d	N	N	N	P/21d	N	N	N
2/SP	+	N	N	N	N	NC	P/30d	NC	NC	P/30d.
3/SP	+	N	P/35d	N	NC	NC	P/29d.	NC	NC	NC
4/SP	+	N	P/15d.	P/28d.	NC	NC	NC	P/30d	N	NC

animal/ Estado	(conclusão)									
	TCC	SM	MD	MS	RF	SMM	PULM.	FIG.	GM	OUTRO
5/SP	+	N	P/70d	N	NC	NC	N	NC	NC	NC

TCC: Teste Cervical Comparativo
 SM: linfonodo submandibular
 MD: linfonodo mediastínico
 MS: linfonodo mesentérico
 RF: linfonodo retrofaríngeo
 SMM: linfonodo supra-mamáreo
 Pulm.: Pulmão
 Fig.: fígado
 GM: glândula mamárea
 N: ausência de isolamento
 P/xd: Isolamento/x dias após cultivo
 NC: material não coletado

O tempo médio de isolamento de micobactérias (tabela 2) dos animais considerados positivos foi de 30 dias, enquanto que, para os animais negativos, foi de 38 dias. O intervalo de tempo entre a semeadura e o primo-isolamento de colônias sugestivas de micobactérias pode sugerir o grupo de espécies envolvidas nos focos de tuberculose.

Koneman et al. (2001) discriminam as espécies de micobactérias de acordo com as suas variações no tempo de crescimento a uma temperatura ideal de incubação de 37°C, considerando uma variação de 12 a 25 dias para o *M. tuberculosis*, 24 a 40 dias para o *M. bovis*, 31 a 42 dias para *M. africanum* e 28 a 60 dias para o *M. ulcerans*.

Analizando a categoria de caprinos positivos ao TCC com isolamento de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* dos respectivos órgãos (tabela 3), verifica-se que dos 129 materiais processados, 53 (41%) resultaram em crescimento de colônias bacterianas, sendo 18 (34%) deles provenientes de amostras de pulmão, 17 (32%) de linfonodo mediastínico e 10 (19%) de linfonodos mesentéricos. Os órgãos que resultaram em menor isolamento foram os linfonodos submandibulares, o fígado, o linfonodo retrofaríngeo, e a glândula mamárea.

O isolamento de bacilos presentes em órgãos e linfonodos que os drenam (figuras 13 e 14) evidencia a localização da infecção, bem como a porta de entrada do agente infeccioso no organismo. Tradicionalmente tem-se considerado a via digestória como a responsável pelas infecções tuberculosas em pequenos ruminantes (CORRÊA; CORRÊA, 1992). A maior frequência de isolamento a partir

do pulmão e linfonodo mediastínico observada no grupo de caprinos positivos ao TCC deste estudo indica a via aerógena como responsável por surtos de tuberculose em caprinos.

Ainda que se considere no manejo alimentar de caprinos em fase de desmama o fornecimento de leite de bovinos como importante veículo da tuberculose (PINHEIRO et al., 2007), o confinamento de caprinos e a co-habitação com outras espécies reservatórias do bacilo da tuberculose são fatores epidemiológicos predisponentes na transmissão aerógena.

Figura 13 – Isolamento de colônias de micobactérias em meio de Stonebrink a partir de inóculo proveniente de pulmão de caprino positivo ao TCC – São Paulo – 2009

Figura 14 – Crescimento em corda de colônias de micobactérias em meio de Stonebrink a partir de inoculo proveniente de linfonodo mediastínico de caprino positivo ao TCC – São Paulo – 2009

Em relação ao grau de infecção dos 27 caprinos pertencentes ao grupo de positivos ao TCC e com isolamento de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, observa-se que 20 (74%) resultaram em crescimento do bacilo proveniente de mais de um órgão. Corrêa e Corrêa (1992) dizem que, tal como nos bovinos, há casos de generalização da infecção em caprinos, quando há escape do bacilo dos focos primários da infecção e colonização de diversos órgãos da economia animal.

Observando os resultados dos exames histopatológicos apresentados na tabela 3 e figuras 15 e 16, dos 27 animais do grupo experimental de positivos ao TCC e com isolamento de micobactéria do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, 21 (78%) apresentaram granuloma em pelo menos um dos órgãos ou tecidos processados e seis (12%) não. De 22 animais pertencentes ao grupo de negativos, 21 não resultaram em isolamento, porém três (14%) deles apresentaram granuloma e 18 (86%) não. Destes três houve isolamento de *C. pseudotuberculosis* em um (33%).

Tabela 3 – Resultados bacteriológicos e histopatológicos de caprinos segundo a identificação, procedência, resultado do Teste Cervical Comparativo (SILVA et al., 2006) e natureza do material processado - São Paulo – 2009

(continua)

animal/Estado	TCC	material	bacteriológico (micobactérias)	bacteriológico (outras bactérias)	histopatológico
474/MG	18,7	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	HE:++
		LMS	-	NR	HE:+
22/MG	17,6	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	-	HE:+
		LMS	COMPLEXO	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	-
157/MG	17,0	LMS	COMPLEXO	NR	-
		L. Rf.	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:+++
96/MG	16,6	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	HE:+++
		LMS	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:+
2/SP	16,6	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	HE:+
		LMS	-	NR	-
		L. Rf.	-	NR	-
		Pulmão	-	NR	-
		Gr. MD	COMPLEXO	NR	HE:+++
63/MG	14,9	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	-
		LSMM	-	-	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	-

(continuação)

animal/Estado	TCC	material	bacteriológico (micobactérias)	bacteriológico (outras bactérias)	histopatológico
127/MG	14,3	LSM	COMPLEXO	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	HE:+
		LMS	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	-
108/MG	13,9	LMS	-	NR	-
		LSMM		NR	-
		GM	COMPLEXO	<i>C.bovis</i>	HE:++
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:+
52/MG	13,6	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
26/MG	13,2	LMS	COMPLEXO	NR	HE:+++
		L.Rf.	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:+++
		Fígado	COMPLEXO	NR	-
4/SP	12,9	LSM	-	NR	HE:+
		LMD	COMPLEXO	NR	HE:++
		LMS	COMPLEXO	NR	HE:+++
		Fígado	-	NR	HE:+
81/MG	12,6	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	-	-
		LMS	-	NR	-
		LSMM	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:++
100/MG	12,3	LSM	COMPLEXO	NR	-
		LMS	-	-	-
		Pulmão	-	NR	-

(continuação)

animal/Estado	TCC	material	bacteriológico (micobactérias)	bacteriológico (outras bactérias)	histopatológico
86/MG	12,1	LSM	-	NR	HE:+
		LMS	-	NR	-
		LSMM	-	NR	-
94/MG	11,2	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
		LSMM	-	NR	HE:+++
101/MG	10,4	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	-
		LMS	COMPLEXO	NR	-
		LSMM	-	contaminação	-
		GM	-	NR	-
39/MG	10,2	LSM	COMPLEXO	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	HE:+++
		LMS	COMPLEXO	NR	HE:++
		L.Rf.	COMPLEXO	NR	-
		LSMM	-	-	-
133/MG	10,0	L.Rf.	-	NR	-
115/MG	10,0	LMD	COMPLEXO	-	HE:+++
		LMS	COMPLEXO	-	-
		L.Rf.	-	NR	-
		Fígado	COMPLEXO	NR	-
1/SP	9,9	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	-
		LMS	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	-
		Rim	-	NR	-

(continuação)

animal/Estado	TCC	material	bacteriológico (micobactérias)	bacteriológico (outras bactérias)	histopatológico
130/MG	9,7	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	HE:++
		LMS	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	-
144/MG	8,4	LMS	COMPLEXO	NR	-
		L.Rf.	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:+++
197/MG	8,3	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
413/MG	7,9	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	-
		LMS	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:+++
3/SP	7,9	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	HE:++
		LMS	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:++
91/MG	7,3	LMS	COMPLEXO	-	HE:++
		L.Rf.	-	-	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:++
		LSMM	-	NR	-
58/PB	6,9	LSM	-	NR	-
		LMS	COMPLEXO	NR	-
		LPE	-	NR	-
		LSMM	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	-

(continuação)

animal/Estado	TCC	material	bacteriológico (micobactérias)	bacteriológico (outras bactérias)	histopatológico
57/MG	6,5	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
		CLT	-	NR	HE:++
		Pulmão	-	NR	-
20/MG	5,4	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	HE:++
		LMS	-	NR	-
129/MG	3,7	L.Retrof.	-	NR	-
184/MG	3,3	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	-	HE:++
		LMS	-	NR	-
146/MG	3,3	LMD	COMPLEXO	NR	-
		LSMM	-	-	-
10/MG	3,2	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
114/MG	2,9	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	-	-
		LMS	-	NR	-
483/MG	2,7	LSM	-	-	-
		LMD	COMPLEXO	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	-
5/SP	2,6	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	-
		LMS	-	NR	-
		Pulmão	COMPLEXO	NR	HE:++

(continuação)

animal/Estado	TCC	material	bacteriológico (micobactérias)	bacteriológico (outras bactérias)	histopatológico
81/PR	2,4	LMS	-	NR	-
		LSMM	-	-	-
		Fígado	-	-	-
		Gr.MD	-	-	-
71/PB	2,3	LMS	-	NR	-
		Pulmão	-	NR	-
		Fígado	-	NR	-
		GM	-	NR	-
		Intest.	-	NR	-
		Pâncreas	-	NR	-
5/PE	1,0	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
21/MG	0,8	L.Rf	-	NR	-
163/MG	0,3	LSM	-	NR	-
		LMD	COMPLEXO	NR	-
		LMS	-	NR	-
4/PE	0,2	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
1/PE	-0,1	LSM	<i>M. kansasii</i>	NR	-
		LMD	<i>M. kansasii</i>	NR	-
		LMS	-	NR	-
9/PE	-0,2	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
6/PE	-0,3	LSM	<i>M. flavescens</i>	NR	-
		LMS	-	NR	-
7/PE	-0,3	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-

(continuação)

animal/Estado	TCC	material	bacteriológico (micobactérias)	bacteriológico (outras bactérias)	histopatológico
5/PR	-0,4	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	HE:+
		LMS	-	NR	HE:+
		LSMM	-	NR	-
		Fígado	-	-	-
106/PR	-0,5	LSM	-	NR	-
		LMD	-	<i>C. pseudo.</i>	HE:+
		LSL	-	NR	-
2/PE	-0,5	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
11/PE	-0,6	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
16/PE	-0,7	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	-
		LMS	<i>M. flavescens</i>	NR	-
10/PE	-0,8	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
12/PE	-1,2	LSM	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
8/PE	-1,3	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
14/PE	-1,5	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
		Fígado	-	<i>C. pseudo.</i>	-

(conclusão)

animal/Estado	TCC	material	bacteriológico (micobactérias)	bacteriológico (outras bactérias)	histopatológico
15/PE	-1,8	LSM	<i>M. flavescens</i>	NR	-
		LMD	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
80/PR	-1,9	LSM	-	NR	-
		LSL	-	NR	-
		LPE	-	NR	-
		L. Hep.	-	NR	HE:+
3/PE	-2,0	LSM	-	NR	-
		LMD	-	NR	-
		LMS	<i>M. avium</i>	NR	-
13/PE	-2,3	LSM	<i>M. florentinum</i> ; <i>M. lentiflavum</i> ; <i>M. simiae</i>	NR	-
		LMD	-	NR	-
		LMS	-	NR	-
10/PB	-6,0	LMS	-	NR	-
		Pulmão	-	NR	-
		Fígado	-	NR	-
		Intest.	-	NR	-
		Rim	-	NR	-

LSM: linfonodo submandibular**LMD:** linfonodo mediastínico**LMS:** linfonodo mesentérico**LSMM:** linfonodo supra-mamário**L. Rf.:** linfonodo retrofaríngeo**LPE:** linfonodo pré-escapular**LSL:** linfonodo sublingual**COMPLEXO:** Complexo *Mycobacterium tuberculosis***C. bovis:** *Corynebacterium bovis***C. pseudo.:** *Corynebacterium pseudotuberculosis***M. flavescens:** *Mycobacterium flavescens***M. kansasii:** *Mycobacterium kansasii***M. avium:** *Mycobacterium avium***L. Hep.:** linfonodo hepático**Gr. MD:** granuloma mediastínico**CLT:** cadeia linfática traqueal**GM:** glândula mamária**Intest.:** intestino**HE:** coloração de Hematoxilina-Eosina**NR:** não realizado*M. florentinum:* *Mycobacterium florentinum**M. lentiflavum:* *Mycobacterium lentiflavum**M. simiae:* *Mycobacterium simiae*

-: ausência de isolamento e/ou granuloma

Figura 15 - Histopatologia de linfonodo de caprino mostrando granuloma com área central de necrose e intenso infiltrado de células ao redor - São Paulo – 2009

Figura 16 - Histopatologia de linfonodo de caprino mostrando granuloma com área central de necrose e intenso infiltrado de células ao redor - São Paulo – 2009

A evidência de granulomas em cortes histológicos nem sempre coincide com a ocorrência de isolamento bacteriano. Cousins et al. (1993) referiu o isolamento de *M. bovis* de um caprino positivo ao teste de tuberculina, o qual não mostrou lesão macroscópica sugestiva. Citou que outros 19 caprinos do mesmo rebanho não tiveram lesões, mesmo sendo reatores ao teste tuberculinico.

Mota et al. (1980), em estudo sobre micobacterioses de suínos do Estado de Minas Gerais, constatou maior proporção de isolamentos em culturas de linfonodos sem lesões macroscópicas. Também referiu outros agentes presentes em lesões sugestivas como *Corynebacterium equi* e *C. pyogenes*.

Andrade et al. (1991), em estudo histológico e de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul, encontraram 92,45% de granulomas com características histopatológicas de tuberculose. No mesmo estudo, assinala que ausência de micobactérias visíveis em cortes histológicos nem sempre corresponde à negatividade na cultura bacteriológica.

A sensibilidade e especificidade das técnicas histopatológicas também podem variar. Bernabé et al. (1991) conseguiram diferenciar lesões causadas por bacilos da tuberculose e paratuberculose em caprinos presentes em linfonodos mesentéricos e outros órgãos infectados.

Gutiérrez Cancela e Garcia Marin (1993) constataram que a técnica de imunohistoquímica evidencia melhor o *M. bovis* nos tecidos. Marcondes et al. (2007) afirmaram que lesões histopatológicas provocadas por *M. flavescens*, *M. kansasii* e *C. pseudotuberculosis* não são diferenciáveis das provocadas por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Neste estudo a coloração de Ziehl-Neelsen aplicada aos materiais encaminhados para exame histopatológico não foi capaz de detectar bacilos álcool-ácido-resistentes devido à autólise gerada na conservação dos órgãos e tecidos.

Na análise da intensidade das lesões granulomatosas encontradas, não se observou correlação com os valores do TCC. Lesslie e Linzell (1960) destacaram dois caprinos com intensidades de resposta imunoalérgica diferentes frente ao teste de tuberculina, sendo o mais reator com menor quantidade de lesões visíveis em linfonodos mediastínico e retrofaríngeo. Paliwal (1985) constatou resposta imunológica mais intensa em caprinos com poucas lesões histopatológicas.

Na tabela 4, que contém em ordem decrescente os valores finais de espessuras da pele de todos os caprinos tuberculinizados, observa-se que dos 36

animais considerados positivos ao TCC, 27 (75%) resultaram em isolamento em pelo menos um dos meios de cultura utilizados; dos 22 animais considerados negativos, sete (32%) tiveram isolamento, e não se obteve isolamento dos dois animais suspeitos. Todas as cepas isoladas do grupo considerado positivo ao TCC (reação $\geq 2,5$ mm) foram confirmadas como sendo micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* pelo PRA.

Tabela 4 – Resultados de isolamento de micobactérias com respectivos tempos de crescimento segundo a identificação do animal, procedência, valores do Teste Cervical Comparativo, meios de cultura e identificação genética - São Paulo – 2009

(continua)

Animal/ Estado	TCC (mm)	Bacteriológico - TB Löwenstein-Jensen							Bacteriológico – TB Stonebrink							Identificação
		SM	MD	MS	Fig.	Pul.	SMM	Outros	SM	MD	MS	Fig.	Pul.	SMM	Outros	
474/MG	18,70	-	-	-	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N	N	-
22/MG	17,60	-	-	-	NC	P/80d	NC	NC	-	P/31d	-	NC	P/25d	NC	NC	Complexo
157/MG	17,00	P/80d	P/30d	-	NC	-	NC	NC	-	P/30d	-	NC	-	NC	NC	Complexo
96/MG	16,60	-	-	-	NC	-	NC	NC	-	P/26d	-	NC	P/39d	NC	NC	Complexo
2/SP	16,60	C	C	-	NC	C	NC	-	C	C	-	NC	P/30d	NC	P/30d	Complexo
63/MG	14,90	-	-	NC	NC	-	-	NC	-	-	NC	NC	P/46d	-	NC	Complexo
127/MG	14,30	-	-	-	NC	-	NC	NC	P/33d	P/28d	-	NC	P/33d	-	NC	Complexo
108/MG	13,90	NC	NC	-	NC	P/12d	-	P/28d	NC	NC	-	NC	P/12d	-	P/40d	Complexo
52/MG	13,60	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	-
26/MG	13,20	NC	NC	-	NC	P/17d	NC	-	NC	NC	-	NC	P/17d	NC	-	Complexo
4/SP	12,90	-	-	P/60d	-	NC	NC	NC	-	P/15d	P/28d	P/30d	NC	NC	NC	Complexo
81/MG	12,60	-	-	-	NC	P/23d	-	NC	-	P/29d	-	NC	P/29d	-	NC	Complexo
100/MG	12,30	-	NC	-	NC	-	NC	NC	P/18d	NC	-	NC	-	NC	NC	Complexo
86/MG	12,10	-	NC	-	NC	NC	-	NC	-	NC	-	NC	NC	-	NC	-
94/MG	11,20	-	NC	-	NC	NC	-	NC	-	NC	-	NC	NC	-	NC	-
101/MG	10,40	-	P/60d	-	NC	NC	NC	NC	-	P/34d	P/47d	NC	NC	NC	NC	Complexo
39/MG	10,20	-	-	-	NC	NC	-	P/55d	P/17d	P/16d	P/13d	NC	NC	-	P/39d	Complexo
133/MG	10,00	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	-
115/MG	10,00	NC	-	P/60d	-	NC	NC	-	NC	P/24d	P/24d	P/24d	NC	NC	-	Complexo
1/SP	9,90	-	-	-	-	P/60d	NC	-	-	P/41d	-	-	P/21d	NC	-	Complexo
130/ MG	9,70	-	-	-	NC	-	NC	NC	-	P/29d	-	NC	P/23d	NC	NC	Complexo
144/MG	8,40	NC	NC	P/60d	NC	-	NC	-	NC	NC	P/30d	NC	P/30d	NC	-	Complexo
197/MG	8,30	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
413/MG	7,90	-	-	-	NC	-	NC	NC	-	P/46d	-	NC	P/32d	NC	NC	Complexo
3/SP	7,90	-	-	-	NC	-	NC	NC	-	P/35d	-	NC	P/29d	NC	NC	Complexo

(continuação)

Animal/ Estado	TCC (mm)	Bacteriológico - TB Löwenstein-Jensen							Bacteriológico - TB Stonebrink							Identificação
		SM	MD	MS	Fig.	Pul.	SMM	Outros	SM	MD	MS	Fig.	Pul.	SMM	Outros	
91/MG	7,30	NC	NC	P/80d	NC	P/60d	NC	-	NC	NC	P/25d	NC	P/25d	NC	-	Complexo
58/PB	6,90	-	NC	-	NC	-	-	-	-	NC	P/60d	P/60d	-	-	-	Complexo
57/MG	6,50	-	NC	-	NC	-	NC	-	-	NC	-	NC	-	NC	-	-
20/MG	5,40	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	P/30d	-	NC	NC	NC	NC	Complexo
129/MG	3,70	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	NC	NC	NC	NC	NC	C	-	-
146/MG	3,30	NC	-	NC	NC	NC	-	-	NC	P/30d	NC	NC	NC	-	-	Complexo
184/MG	3,30	-	P/80d	-	NC	NC	NC	NC	-	P/28d	-	NC	NC	NC	NC	Complexo
10/MG	3,20	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
114/MG	2,90	-	-	-	NC	-	NC	NC	-	P/23d	-	NC	P/23d	NC	NC	Complexo
483/MG	2,70	-	P/26d	NC	NC	-	NC	NC	-	P/26d	-	NC	P/26d	NC	NC	Complexo
5/SP	2,60	-	-	-	NC	-	NC	NC	-	P/70d	-	NC	P/40d	NC	NC	Complexo
81/PR	2,40	NC	NC	-	-	NC	-	-	NC	NC	-	-	NC	-	-	-
71/PB	2,30	NC	NC	-	-	-	NC	-	NC	NC	-	-	-	NC	-	-
5/PE	1,0	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-
21/MG	0,80	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	-
163/MG	0,30	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	P/27d	-	NC	NC	NC	NC	Complexo
4/PE	0,20	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
1/PE	-0,10	-	P/50d	-	NC	NC	NC	NC	P/50d	-	-	NC	NC	NC	NC	<i>M. kansasii</i>
9/PE	-0,20	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
6/PE	-0,30	P/30d	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	<i>M. flavescens</i>
5/PR	-0,40	-	-	-	-	NC	-	NC	-	-	-	-	NC	-	NC	-
106/PR	-0,50	-	-	NC	NC	NC	NC	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	-
11/PE	-0,60	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
16/PE	-0,70	-	-	P/60d	NC	NC	NC	NC	-	-	P/45d	NC	NC	NC	NC	<i>M. flavescens</i>
10/PE	-0,80	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-

(conclusão)

Animal/ Estado	TCC (mm)	Bacteriológico - TB Löwenstein-Jensen							Bacteriológico - TB Stonebrink							Identificação
		SM	MD	MS	Fig.	Pul.	SMM	Outros	SM	MD	MS	Fig.	Pul.	SMM	Outros	
12/PE	-1,20	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
8/PE	-1,30	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-
14/PE	-1,50	-	-	-	-	NC	NC	NC	-	-	-	-	NC	NC	C	-
15/PE	-1,80	-	-	-	NC	NC	NC	NC	P/45d	-	-	NC	NC	NC	NC	<i>M. flavescens</i>
80/PR	-1,90	-	NC	NC	NC	NC	NC	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	-	-
3/PE	-2,00	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	-	P/40d	NC	NC	NC	NC	<i>M. avium</i> <i>M. florentinum</i> - <i>M. lentiflavum</i> -
13/PE	-2,30	P/21d	P/7d	P/70d	NC	NC	NC	NC	-	-	-	NC	NC	NC	NC	<i>M. simiae</i>
10/PB	-6,00	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
12/PE	-1,20	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
8/PE	-1,30	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-
14/PE	-1,50	-	-	-	-	NC	NC	NC	-	-	-	-	NC	NC	C	-
15/PE	-1,80	-	-	-	NC	NC	NC	NC	P/45d	-	-	NC	NC	NC	NC	<i>M. flavescens</i>
80/PR	-1,90	-	NC	NC	NC	NC	NC	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	-	-
3/PE	-2,00	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	-	P/40d	NC	NC	NC	NC	<i>M. avium</i> <i>M. florentinum</i> - <i>M. lentiflavum</i> -
13/PE	-2,30	P/21d	P/7d	P/70d	NC	NC	NC	NC	-	-	-	NC	NC	NC	NC	<i>M. simiae</i>
10/PB	-6,00	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-	NC	NC	NC	NC	-

SM: Linfonodo submandibular**MD:** Linfonodo Mediastino**MS:** Linfonodo Mesentérico**Fig:** Fígado**Pul.:** Pulmão**SMM:** Linfonodo supra- mamáreo

- : Cultivo negativo

NC: Material não coletado

P/Xd: Isolamento/ dias pós cultivo

TCC: teste cervical comparativo

M. Kansasii: *Mycobacterium kansasii**M. flavescens:* *Mycobacterium flavescens***Complexo: complexo *M. tuberculosis****M. avium:* *Mycobacterium avium**M. florentinum:* *Mycobacterium florentinum**M. lentiflavum:* *Mycobacterium lentiflavum**M. simiae:* *Mycobacterium simiae*

No grupo controle negativo ao TCC (reações <1,9mm) houve isolamento de seis cepas de micobactérias ambientais sendo três (50%) de *M. flavescens*, provenientes de linfonodos submandibulares e mesentérico, uma (17%) de *M. kansasii*, proveniente dos linfonodos submandibulares e mediastínico, uma (17%) de *M. avium*, proveniente de linfonodo mesentérico e uma (17%) cepa caracterizada como do complexo *M. florentinum* – *M. lentiflavum* – *M. simiae*, de linfonodos submandibulares, mediastínico e mesentérico.

Observando-se o grupo negativo, nota-se o isolamento de uma micobactéria pertencente ao complexo *M. tuberculosis* em um animal negativo ao TCC, procedente do Estado de Minas Gerais (animal 163/MG). Esse resultado pode ser interpretado como um caso de infecção recente, já que não se observa lesão histopatológica granulomatosa no material correspondente, o que seria indicativo da sensibilização do animal após a infecção (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Também não seria possível interpretar este resultado como um caso de anergia, pois esta é mais associada a casos de tuberculose crônica, com extensas lesões nodulares calcificadas (LESSLIE; LINZELL, 1960; CORRÊA; CORRÊA, 1992).

O isolamento de micobactérias ambientais em animais negativos a testes imunoalérgicos pode ocorrer (MARCONDES et al., 2007) e dependendo da prova de tuberculina utilizada pode ser a causa de reações inespecíficas, justificando a necessidade de utilização do TCC.

O *Mycobacterium flavescens* é considerado agente comensal para humanos, e não tem importância epidemiológica para os animais de produção. O *Mycobacterium kansasii* tem relativa importância epidemiológica para humanos, sendo causa de infecções extrapulmonares disseminadas, quadros de linfadenite, infecções cutâneas semelhantes à esporotricose e osteomielites em pacientes imunodeprimidos. Tem sido crescente o isolamento de cepas dessa espécie que são resistentes a isoniazida (KONEMAN et al., 2001).

O *Mycobacterium avium* é de ocorrência rara no Brasil. Em outros países é descrito como causador de mastites (LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1976; CORRÊA; CORRÊA, 1992). Em países da África do Sul e na França, tem importância epidemiológica em suínos e bovinos, e em diversos países as aves domésticas e silvestres, além de desenvolverem tuberculose, constituem importantes reservatórios para animais de produção (THOREL et al., 1997).

Embora infecções por *Mycobacterium avium* em pequenos ruminantes e em humanos têm sido considerados eventos raros (THOREL et al., 1997; KONEMAN et al., 2001), relatos atuais de isolamento dessa espécie evidenciam a ocorrência nesses animais de produção e o risco de transmissão ao homem.

Singh e Viham (2003) reportam o primeiro caso de isolamento de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* em leite de cabra na Índia, e atentam para o risco de caprinos serem fonte de infecção para crianças que consomem o leite por eles produzido.

Kruze et al. (2006) relatam o primeiro caso de isolamento de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* em caprino no Chile com quadro clínico compatível com paratuberculose. Houve correlação de achados histopatológicos com teste sorológico, isolamento bacteriano e confirmação do agente por técnica de biologia molecular.

Esteves-Denaives et al. (2007), executando o cultivo bacteriano e a técnica de biologia molecular a partir de amostras de mucosa do íleo de caprinos e ovinos previamente testados sorologicamente para a paratuberculose, mostraram ampla difusão da infecção por *M. avium* subsp. *paratuberculosis* em rebanhos no México.

Sevilla et al. (2008), realizaram um estudo epidemiológico, nos Estados Unidos, utilizando 268 amostras de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isoladas de diferentes hospedeiros, entre eles caprinos, ovinos e bovinos. Ao compararem a técnica de reação em cadeia pela polimerase, na detecção de seqüências repetitivas de DNA das micobactérias, com a técnica de eletroforese em campo pulsado, apontaram diferenças evolutivas entre as cepas isoladas dos diferentes hospedeiros.

O método PRA não foi capaz de discriminar as espécies *Mycobacterium simiae*, *M. lentiflavum* e *M. florentinum*. Rocha et al. (1999), utilizando a mesma técnica, descreveram o primeiro isolado de *M. lentiflavum*, com padrão eletroforético diferente de outras micobactérias ambientais e do complexo *M. tuberculosis*.

O *Mycobacterium simiae* pertence ao grupo III de Runyon e é uma espécie que foi primeiramente isolada de macacos (*Macaca rhesus*) importados da Índia para a Hungria, e tem importância epidemiológica em países como Estados Unidos e Israel, onde são responsáveis por causar doença progressiva em pacientes humanos imunossuprimidos (KONEMAN et al., 2001).

Na literatura consultada, não há consenso quanto à classificação taxonômica das possíveis espécies *Mycobacterium lentiflavum* e *M. florentinum*. Através de estudos com aplicação de técnica de cromatografia gasosa, Springer et al. (1996) verificaram características peculiares na composição lipídica de parede celular da espécie *M. lentiflavum* e mostraram que o seqüenciamento do gene 16S revelou apenas uma porção gênica comum às espécies de *M. simiae* e *M. gordonae*.

Tortoli et al. (2005), aplicando as metodologias utilizadas por Springer et al. (1996), em isolados de esputo humano, notaram diferenças na estrutura da parede celular de espécies com padrão eletroforético correspondente à *M. lentiflavum*, propondo a nomenclatura *M. florentinum*.

Molteni et al. (2005) descreveram um caso de tuberculose humana na Itália causada por *M. lentiflavum* isolado de linfonodo de uma criança e ressaltaram a dificuldade da conduta terapêutica.

Koneman et al. (2001) relataram que os índices de recuperação de micobactérias viáveis provenientes de amostras biológicas dependem do método de tratamento para descontaminação das mesmas, da tolerância individual das cepas frente ao agente descontaminante, e das características do meio de cultura.

Mullahy (1950), Kudoh e Kudoh (1974) e o Centro Panamericano de Zoonoses (1985) relataram diferentes resultados de cultivo de micobactérias, ao testarem diferentes métodos de digestão de amostras e cultivo.

O método de descontaminação e semeadura dos inóculos provenientes dos órgãos dos caprinos utilizado no presente estudo foi uma variação da técnica de Petroff recomendada pelo Centro Panamericano de Zoonoses (1985), em que se modificaram algumas das etapas, com objetivo de se recuperar o máximo de bacilos viáveis das lesões caseosas e dos tecidos íntegros, a fim de aumentar a sensibilidade da técnica.

Na tabela 4 observa-se que, dos 27 animais do grupo positivo que resultaram em crescimento bacteriano, 14 (52%) ocorreram no meio de Stonebrink e 13 (48%) nos dois meios de cultivo utilizados. Dos isolados de sete animais do grupo negativo, três (43%) ocorreram no meio de Stonebrink, dois (29%) no meio de Löwenstein-Jensen e dois (29%) em ambos.

O meio de cultura de Stonebrink é tradicionalmente recomendado para o isolamento de *M. bovis*, devido a seu baixo teor de glicerol o qual favorece o crescimento dessa espécie de micobactéria, que ocorre melhor em uma atmosfera

de microaerofilia. O meio de Löwenstein-Jensen é utilizado no isolamento de micobactérias oportunistas (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985).

Koneman et al. (2001) descreveram o meio de Stonebrink sem glicerol e com 0,4% de piruvato como o mais favorável ao isolamento dessa espécie. Seva et al. (2002) isolaram *M. bovis* em culturas de Löwenstein-Jensen a partir de amostra de cabras produtoras de leite. Corner e Nicolapopoulos (1988) referiram que o crescimento diferencial nos meios de cultura não deve ser utilizado como único diferencial para a definição da espécie de micobactéria.

A cepa de *M. avium* caracterizada pelo PRA e proveniente de um animal do grupo de negativo ao TCC (animal 3/PE) foi isolada em meio de Stonebrink após 40 dias de cultivo (tabela 4). O meio de Stonebrink é seletivo para o crescimento de *M. bovis*, entretanto houve o isolamento do *M. avium*, com tempo de crescimento considerado compatível para essa espécie. Thorel et al. (1997) citaram que o *M. avium* é mais frequentemente isolado após o *M. bovis*, enquanto Koneman et al. (2001) consideravam um intervalo variável de 10 a 21 dias para o isolamento de *M. avium* e de 24 a 40 dias para o *M. bovis*.

Diante dos resultados obtidos pelo padrão preconizado por Silva et al. (2006) e apresentados nas tabelas 3 e 4, pode-se observar que foram identificados 36 animais positivos dos quais 31 tiveram comprovação bacteriológica e/ou histopatológica. Se fosse adotado o TCC com o padrão do MAPA de interpretação (positividade $\geq 4\text{mm}$), 5 animais que tiveram isolamento teriam sido considerados suspeitos. Pelo teste MacNemar-Bowker, que comparou os padrões do MAPA e Silva et al. (2006), houve uma boa concordância entre os dois parâmetros ($p=0,008$) com um valor Kappa de 0,80.

O padrão de Silva et al. (2006), quando avaliadas as categorias de positividade ou não ao TCC frente ao isolamento de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, apresentou pelo teste de MacNemar ($p=0,027$) uma sensibilidade de 96,4% e especificidade de 70% e uma boa concordância (Kappa=0,66). No padrão do MAPA, a sensibilidade foi de 95,7% e a especificidade de 75% ($p=0,077$) e boa concordância (Kappa=0,69).

A análise de concordância foi boa nas duas simulações de aplicação dos parâmetros de interpretação do TCC, entretanto observa-se decréscimo de sensibilidade diagnóstica quando se utilizam os padrões do MAPA. Essa perda de sensibilidade poderia resultar na ocorrência de resultados falso-negativos ao TCC,

caso se utilizasse o padrão bovino de interpretação das respostas imunoalérgicas na tuberculinização de caprinos.

Com o objetivo de diagnosticar a tuberculose em caprinos, causada pela infecção natural por *M. bovis*, Acosta et al. (2000) utilizaram o TCS e verificaram que esse método apresentava uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 65%. Porém, Gutiérrez, Tellechea e Garcia Marin (1998), avaliando testes diagnósticos para a detecção de caprinos infectados por essa espécie de micobactéria, encontraram uma sensibilidade de 83,7% e uma especificidade de 100%, no TCC, o qual é utilizado comumente para diferenciar respostas inespecíficas (MAPA, 2001).

A recomendação de abate de todos os animais positivos e suspeitos é preconizada pelo MAPA (2001) para eliminação de foco de tuberculose. Neste caso os resultados do presente trabalho seriam na prática idênticos aos do Mapa em número de animais abatidos. Entretanto, para focos em fase inicial de controle e saneamento, trabalhar com um teste mais sensível seria recomendável, pois estariam sendo identificados animais infectados com maior segurança; foi o que se observou em cinco animais identificados no TCC (SILVA et al., 2006), dos quais se isolaram bacilos do complexo *M. tuberculosis*.

O diagnóstico da tuberculose em caprinos deve ser implantado nos sistemas de criação e manejo de programas sanitários direcionados a esta espécie. Embora na literatura brasileira tenham sido encontrados poucos trabalhos no tema, este estudo, utilizando o padrão determinado por Silva et al. (2006) conseguiu identificar focos em três estados brasileiros.

A comprovação bacteriológica, histopatológica e biomolecular da positividade ao TCC, realizada no presente estudo, validam o padrão de Silva et al. (2006) como ferramenta a ser utilizada na identificação da tuberculose na espécie caprina.

6 CONCLUSÕES

Nas condições do referido trabalho, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- Foram identificados focos de tuberculose em caprinos nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraíba.
- Das lesões sugestivas de tuberculose foram isoladas micobactérias do complexo *M. tuberculosis* e micobactérias atípicas.
- Houve isolamento concomitante de *Corynebacterium bovis* e micobactéria do complexo *M. tuberculosis*.
- No exame macroscópico e histopatológico não foi possível discriminar lesão causada por *Corynebacterium bovis* ou por micobactéria do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.
- Os resultados dos exames bacteriológicos, histopatológicos e da identificação genética das cepas de micobactérias isoladas validam a utilização do padrão de Silva et al. (2006) no Teste Cervical Comparativo (TCC) para o diagnóstico da tuberculose em caprinos.

7 REFERÊNCIAS*

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).

ACOSTA, B.; REAL, F.; FERRER, O.; DENIZ, S.; POVEDA, J. B. Isolation of *Mycobacterium kansasii* from a tuberculin-positive goat. **The Veterinary Record**, v. 21, p.195-196, 1998.

ACOSTA, B.; REAL, F.; LÉON, L.; DÉNIZ, S.; FERRER, O.; ROSARIO, I.; RAMIREZ, A. Elisa for anti-MPB70: an option for the diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 6, p. 423-424, 2000.

ALVAREZ, J.; JUAN, L.; BEZOS, J.; ROMERO, B.; SÁEZ, J. L.; GORDEJO, F. J. R.; BRIONES, V.; MORENO, M. A.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; ARANAZ, A. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p.72-80, 2008.

ALMEIDA RIBEIRO, S. D. **CAPRINOCULTURA – Criação Racional de Caprinos**. Edição reimpressa, São Paulo, Nobel, 1998.

ANDERSON, W. I.; KING, J. M. *Mycobacterium avium* infection in a pygmy goat. **The veterinary Record**. V. 13, p. 502, nov 1993.

ANDRADE, G. B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P. V.; MÉNDEZ, M. D. C.; SCHILD, A. L. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.11, n. 3/4, p. 81-86, jul./dez. 1991.

* Conforme as Diretrizes para apresentação de Dissertações, Teses e Trabalhos Acadêmicos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. rev. atual. ampl. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84p.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE CAPRINOS E OVINOS, Impresso Especial da Revista O Berro, p. 105-106, 2008.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMINGUES, L. Elevation of *Mycobacterium caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 53, p. 1785-1789, 2003.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GOMES-MANPASO, E.; GÁLÁN, J. C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SÚAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1263-1273, 1999.

ARELLANO, R. B.; RAMIREZ, C. I. C.; DÍAZ, A. E.; VALERO, E. G.; SANTILLAN, F. M. A. Diagnóstico de tuberculosis em hatos de caprinos empleando la prueba intradérmica doble comparada y cultivo bacteriológico. **Técnica Pecuária do México**, v. 37, n. 1, 1999.

ASHFAQ, M. K.; CAMPEBELL, S. G.; A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. **Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician**, p. 1161-1165, Ago, 1979.

AYRES, J.L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA**, n.171, p. 1251-1254, 1977.

BENESI, F. J.; PINHEIRO, S. R.; MAIORKA, P. C.; SAKAMOTO, S. M.; ROXO, E.; BENITES, N. R.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L. Relato de caso: tuberculose em caprino (*Capra hircus*). **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 75, n. 2, p.217-220, abr./jun., 2008.

BERNABÉ, A.; GÓMEZ, M. A.; NAVARRO, J.A.; GÓMEZ, S.; SÁNCHEZ, J.; SIDRACH, J.; MENCHÉN, V. Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. **Small Ruminant Research**, v. 5, p. 377-390, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. 2001. (publicação eletrônica). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/das/dda/in10.htm>>. Acesso em: set 2006.

BUIJTELS, P. C. A. M.; PETIT, P.L.C. Comparison of Naoh-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **Jornal of Microbiologica Methods**. v. 62, n.1, p. 83-88, jul 2005.

BURREL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Australian Veterinary Journal**, n.57, p.105-110, 1981.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Manual de normas y procedimientos tecnicos para la bacteriología de la tuberculosis. **Organização Panamericana de la Salud**. n. 27, 1985.

CHIMARA, E.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; MARTINS, M. C.; TELLES, M. A. S.; UEKI, S. Y. M.; FERRAZOLI, L. Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the State of São Paulo between 1995-1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.7, p.739-743, 2004.

CORDES, D. O.; BULLIANS, J. A.; LAKE, D. E.; CARTER, M. E. Observations on tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v.1/2, p.61-63, 1981.

CORNER, L. A.; NICOLAPOPOULOS, C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 7, p. 202-204, jul, 1988.

CORRÊA, J. G. Z.; PINHEIRO, S. R.; RODRIGUES, C. F. C.; LEINZ, F. F.; BENESI, F. J. Estudo da resposta alérgica à tuberculina em caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados, em diferentes regiões corpóreas. **O Biológico**, v. 70, n. 2, p. 140, jul/dez 2008.

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

COSIVI, O.; GRANJE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUGIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.1, 1998.

COUSINS, D. V.; FRANCIS, B.R.; CASEY, R.; MAYBERRY, C. *Mycobacterium bovis* infectio in a goat. **Australian Veterinary Journal**. v. 70, n. 7, p.262-263, jul. 1993.

COUTINHO, A. A. A evolução da caprino-ovinocultura. **Revista O Berro**, v.98, n. 8, p. 146-148, fev 2007.

DEVALLOIS, A.; GOH, K. S.; RASTOGI, N. S. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of na algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2969-2973, 1997.

ESTEVEZ-DENEIVES, I.; HERNANDEZ-CASTRO, R.; TRUJILLO-GARCIA, A. M.; CHAVEZ-GRIS, G. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in México. **Small Ruminant Research**. v. 72, p.209-213, 2007.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária, a arte do diagnóstico**. São Paulo. Roca, v. 1, 2004.

GUTIÉRREZ CANCELA, M. M.; GARCIA MARIN, J.F. Comparison of Ziehl-Neelsen Staining and Immunohistochemistry for the Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine and Caprine Tuberculous Lesions. **Journal of Comparative Pathology**. v. 109, p. 361-370, 1993.

GUTIÉRREZ, M.; SAMPER, S.; JIMÉNES, M. M.; EMBDEN, J. D. A.; GARCIA-MARÍN, J. F.; MARTÍN, C. Identification by spoligotyping of Caprine Genotype in *Mycobacterium bovis* Strains Causing Human Tuberculosis, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.12, p.3328-3330, Dez. 1997.

GUTIÉRREZ, M.; TELLECHEA, J.; MARÍN, J. F. G. Evaluation of cellular and serological diagnostics tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 281-290, 1998.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Nacional**, v.35, Brasil, 2007.

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

KRUZE, J.; SALGADO, M.; PAREDES, E.; MELLA, A.; COLLINS, M.T. Goat paratuberculosis in Chile: first isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in a dairy goat. **J. Vet. Diagn. Invest.** v. 18, p. 476-479, 2006.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bull. World Health Organization**. v. 51, p. 71-82, 1974.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J. Micobactérias atípicas isoladas de amígdalas e linfonodos de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v.bacillus. **The Veterinary Record**, v. 72, n. 2, p. 25-27,1960.

LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C. H.; MOTA, P. M. P. C.; LEITE, R. C. Reações Inespecíficas no Diagnóstico Alérgico da tuberculose Bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 4, p. 145-149, 1981.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; SCHERER, P. O. Prevalência e diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos do estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n. 1/2, p. 31-34, 1991.

LARSEN, A. B. The Evaluation of Acid-Fast Allergens on Sensitized Goats. **American Journal Veterinary Research**, p. 545-548, oct 1952.

LESSLIE, I. W.; FORD, E. J. H.; LINZELL, J. L. Tuberculosis in goats caused by the avian type tubercule ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*. Considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Arch. Vet. Scient.** v. 4, n. 1, p.5-15, 1999.

LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; URQUIA, J. J.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. **Australian Veterinary journal**, v. 76, n. 1, jan 1998.

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 145-151, 2000.

LUKE, D. Tuberculosis in the horse, pig, sheep and goat. **The Veterinary Record**, v. 70, n. 26, p. 529-536,1958.

MACKINNON, A. A spreads heet for calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Computer in Biology and Medicine**, v. 30, n.3, p.127-134, 2000.

MAPA - 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: set 2006.

MALONE, F. E.; WILSON, E. C.; POLLOCK, J. M.; SKUCE, R. A. Investigation into an Outbreak of Tuberculosis in a Flock of Sheep in Contact with Tuberculous Cattle. **Journal Veterinary Medicine**, v.50, p. 500-504, 2003.

MARCONDES, A. G.; **Micobacteriose de ovino (*Ovis aries*) do Estado de São Paulo, Brasil. Correlação entre teste imunoalérgico, cultivo e histopatológico.** Tese (doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MELO, M.T.; MELO, L.E.H.; SALDANHA, S. V.; EVÊNCIO-NETO, J.; TENÓRIO, T.G.S.; NASCIMENTO, E. T. S.; FERNANDES, A. C. C. Ocorrência da tuberculose caprina no Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.72, supl. 2, p. 25, 2005.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A., **Bacteriologia y Virologia Veterinarias**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, p. 437-452, 1975.

MILNE, A. H. An outbreak of tuberculosis in goats in tanganyica. **The Veterinary Record**, v. 647, p. 374-375, 1955.

MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 153-177, 1994.

MOTA, P. M. P. C. **Tuberculose bovina: diagnóstico e controle**. 2003. 48p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

MOLTENI, C.; GAZZOLA, L.; CESARI, M.; LOMBARDI, A.; SALERNO, F.; TORTOLI, E.; CODECASA, L.; PENATI, V.; FRANZETTI, F.; GORI, A. *Mycobacterium lentiflavum* Infection in Immunocompetent Patient. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n. 1, jan. 2005.

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. **Tuberculose bovina: diagnóstico e controle**. 2003. 48p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

MOTA, P. M. P. C.; LANGENEGGER, C. H.; LEITE, R. C.; LANGENEGGER, J. Micobactérias isoladas de suínos do Estado de Minas Gerais. **Rev. Microbiol. (S. Paulo)**, v. 11, n. 1, 1980.

MULLAHY, M. E. Detetion of Acid-Fast bacilli. Use of Sodium Hydroxide and Trisodium Phosphate as Digestants in Preparing Specimens. **American Journal of Clinical Pathology**, v.20, n.5, jun 1950.

MURRAY, P R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999.

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; GERDES, S. R. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 443-436, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Manual de segurança biológica em laboratório, 3 ed., 2004. Disponível em www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/bislabmanual3rdwebport.pdf

PALIWAL, O. P.; KUMAR, R.; SOMVANSHI, R. The immune spectrum of *Mycobacterium johnei* infections in goats. **Indian Veterinary journal**, v. 62, p. 743-747, 1985.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1995, 598p.

PERRIN, G.; SAVEY, M.; BARADAT, E. La tuberculose de la chèvre: identification et contrôle. **Le Point Vétérinaire**. v. 16, n. 81, mai-juin, 1984.

PIGNATA, W. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; DANTAS, A. F. M.; GOMES, A. A. B.; REMÍGIO, F. R.; LIMA, F. S.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; ALMEIDA, C. A. S. Tuberculose em caprinos no semi-árido brasileiro: Estudos patológico e bacteriológico. **Anais do 35 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008**. Disponível em www.sovergs.com.br/combravet2008/ Acesso em: dez 2008.

PINHEIRO, S. R.; ROXO, E.; ALMEIDA, C. A. S.; VASCONCELLOS, S. A.; SILVANTOS, M. C. C.; MAIORKA, P. C.; MELVILLE, A. M. P.; BENITES, N. R.; PAES, A. C. Surto de tuberculose em caprinos (*Capra hircus*), **Anais do XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária - ENAPAVE**, Mato Grosso do Sul, 2007. Disponível em www.eqrural.ufms.br/enapave/

PRODINGER, W. M.; EIGENTLER, A.; ALLERBERGER, F.; SCHONBAUER, M.; GLAWISCHNIG, W. Infection Red Deer, Cattle, and Humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in Western Austria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 6, p. 2270-2272, jun 2002.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**, 1. ed., Roca, 2005. 507 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária - Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002. 1737p.

RATNAM, S.; STEAD, F.A.; HOWES, M. Simplified Acetylcysteine-Alkali Digestion-Decontamination Procedure for Isolation of Mycobacteria from Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 8, p.1428-1432, Aug. 1987.

RIBEIRO, E. L. A.; Ribeiro, H. J. S. S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina: Ci. Agrárias, Londrina**, v. 22, n. 2, p. 229-235, jul/dez 2001.

ROCHA, A. S.; COSTA LEITE, C.; TORRES, H. M.; MIRANDA, A. B.; LOPES, M. Q. P.; DEGRAVE, W. M.; SUFFYS, P.N. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. **Journal of Microbiological methods**, v. 37, n.3, p.223-229, set. 1999.

ROXO, E. **Avaliação da resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina em bubalinos (*Bubalus bubalis*)**. 1996. 57f. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SEVILLA, I.; LI, L.; AMONSIN, A.; GARRIDO, J. M.; GUIJO, M. V.; KAPUR, V.; JUSTE, R.A. Comparative análisis of Mycobacterium avium Subs.. paratuberculosis isolates from cattle, sheep and goats by short sequence repeat and pulsed-field gel electrophoresis typing. **BMC microbiology**, v.8, 2008.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Porto Alegre. Ed. Artmed, 2006, 448p.

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

SILVA, P. E. G. **Padronização do alérgoteste da tuberculina em caprinos (*Capra hircus*)**. 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SINGH, S.; VIHAM, V. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 54, n.3, p.231-235, 2003.

SMITH, B. P.; **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3 ed. ,Manole, 2006. 1784p.

SOLIMAN, K. N.; ROLLINSON, D. H. L.; BARRON, N. S.; SPRATLING, F. R. An outbreak of naturally acquired tuberculosis in goats. **The Veterinary Record**, v. 65, n. 27, p. 421-425, 1953.

SPRINGER, B.; WU, W.; BODMER, T.; HAASE, G.; PFYFFER, G. E.; KROPPESTEDT, R. M.; SCHRODER, K.; KILBURN, J. O.; KIRSCHNER, P.; TELENTI, A.; COYLE, M. B.; BOTTGER, C. Isolation and characterization of a Unique group of slowly growing mycobacteria: Description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.5, p.1100-1107, mai 1996.

THOREL, M. F.; AUCLAIR, D.; PETIT, H.; VANDEVELDE, J. Tuberculose de la chèvre: diagnostic biologique. **Ann. Rech. Vet.**, v. 11, n.3, p. 251-257, 1980.

THOREL, M. F.; GAUMONT, R. Contribution à l'étude des réactions sérologiques et allergiques chez la chèvre sensibilisée par des antigènes tuberculeux. **Bull. Acad. Vét. Fr.**, v. 50, p. 549-568. 1977.

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.

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

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2 ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995, 479p.

TORTOLI, E.; RINDI, L.; GOH, K. S.; KOTILA, M. L.; MARIOTTINI, A.; MATTEI, R.; MAZZARELLI, G.; SUOMALAINEN, S.; TORKKO, P.; RASTOGI, N. *Mycobacterium florentinum* sp. nov., isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1101-1106, 2005.

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.

WANASINGHE, D. D.; PINTO, M. R. M.; NAVARATNAM, C.; WELIANGE, L. V. Studies in tuberculin sensitivity of livestock in Ceylon. III. Patterns of sensitivity in the goat. **Ceylon Veterinary Journal**, v. 21, n. 3/4, p. 46-51, 1973.

ZANI, J. L.; COSTA, E. O. Avaliação das vias de transmissão de infecção da mastite bovina por *Corynebacterium bovis*. **Revista Napgama São Paulo**, v. 8, n.1, p. 18-22, 2005.

Apêndice – Resultados dos testes tuberculínicos de caprinos selecionados, segundo procedência, identificação, momento de leitura e tipo de tuberculina utilizada – São Paulo – 2009

(continua)

n. animal/ Estado	0 hora		72 ± 6 horas		Δ Av	Δ Bv	ΔBv-ΔAv	Resultado
	PPDa.	PPDb.	PPDa.	PPDb.				
483 (MG)	2,90	3,20	3,80	6,80	0,90	3,60	2,70	Positivo
10 (MG)	2,90	2,30	7,00	9,60	4,10	7,30	3,20	Positivo
108 (MG)	3,30	2,70	15,70	29,00	12,40	26,30	13,90	Positivo
130 (MG)	3,10	2,50	6,40	15,50	3,30	13,00	9,70	Positivo
127 (MG)	3,20	2,90	7,00	21,00	3,80	18,10	14,30	Positivo
184 (MG)	2,70	3,40	13,50	17,50	10,80	14,10	3,30	Positivo
81 (MG)	3,40	2,50	6,80	18,50	3,40	16,00	12,60	Positivo
52 (MG)	2,90	2,60	13,20	26,50	10,30	23,90	13,60	Positivo
94 (MG)	2,40	2,40	4,80	16,00	2,40	13,60	11,20	Positivo
474 (MG)	3,20	2,50	10,00	28,00	6,80	25,50	18,70	Positivo
133 (MG)	3,20	2,70	11,00	20,50	7,80	17,80	10,00	Positivo
63 (MG)	3,00	3,00	7,80	22,70	4,80	19,70	14,90	Positivo
20 (MG)	2,10	2,00	4,70	10,00	2,60	8,00	5,40	Positivo
129 (MG)	2,70	2,60	6,90	10,50	4,20	7,90	3,70	Positivo
413 (MG)	2,50	2,40	15,70	23,50	13,20	21,10	7,90	Positivo
101 (MG)	2,30	2,10	4,00	14,20	1,70	12,10	10,40	Positivo
86 (MG)	2,90	2,80	7,00	19,00	4,10	16,20	12,10	Positivo
96 (MG)	3,20	2,90	6,70	23,00	3,50	20,10	16,60	Positivo
39 (MG)	2,80	2,60	5,50	15,50	2,70	12,90	10,20	Positivo
22 (MG)	3,10	2,50	5,50	22,50	2,40	20,00	17,60	Positivo
14 (MG)	2,40	2,00	11,50	19,50	9,10	17,50	8,40	Positivo
91 (MG)	2,40	2,10	12,50	19,50	10,10	17,40	7,30	Positivo
197 (MG)	2,80	2,70	3,60	11,80	0,80	9,10	8,30	Positivo
114 (MG)	2,90	2,80	3,40	6,20	0,50	3,40	2,90	Positivo
146 (MG)	2,40	2,60	10,00	13,50	7,60	10,90	3,30	Positivo
115 (MG)	2,80	2,80	15,50	25,50	12,70	22,70	10,10	Positivo
157 (MG)	3,30	3,00	6,80	23,50	3,50	20,50	17,00	Positivo
57 (MG)	2,50	2,30	17,50	23,80	15,00	21,50	6,50	Positivo
100 (MG)	3,00	2,70	9,00	21,00	6,00	18,30	12,30	Positivo
26 (MG)	2,50	2,80	10,00	23,50	7,50	20,70	13,20	Positivo
1 (SP)	2,00	15,00	2,20	17,80	13,00	15,60	2,60	Positivo
2 (SP)	2,80	3,80	2,40	20,00	1,00	17,60	16,60	Positivo
3 (SP)	2,50	7,90	1,70	17,00	5,40	15,30	9,90	Positivo
4 (SP)	2,80	9,70	2,40	22,20	6,90	19,80	12,90	Positivo
5 (SP)	1,40	14,10	1,60	22,20	12,70	20,60	7,90	Positivo
58 (PB)	#	#	#	#	4,60	11,50	6,90	Positivo
71 (PB)	#	#	#	#	6,70	9,00	2,30	Inconcl.
81 (PR)	7,40	4,40	5,70	6,80	0	2,40	2,40	Inconcl.
1 (PE)	4,50	3,60	3,90	4,10	-0,60	0,50	0,0	Negativo
2 (PE)	3,90	3,70	5,50	4,80	1,60	1,10	-0,50	Negativo

(conclusão)

n. animal/ Estado	0 hora		72 ± 6 horas		Δ Av	Δ Bv	Δ Bv- Δ Av	Resultado
	PPDa.	PPDb.	PPDa.	PPDb.				
3 (PE)	2,90	3,00	4,90	3,00	2,00	0	-2,00	Negativo
4 (PE)	4,50	3,20	5,00	3,90	0,50	0,70	0,20	Negativo
5 (PE)	3,90	3,00	4,10	4,20	0,20	1,20	1,00	Negativo
6 (PE)	3,90	2,70	5,30	3,80	1,40	1,10	-0,30	Negativo
7 (PE)	3,40	3,10	4,70	4,10	1,30	1,00	-0,30	Negativo
8 (PE)	3,50	3,20	5,30	3,70	1,80	0,50	-1,30	Negativo
9 (PE)	2,70	2,80	3,90	3,80	1,20	1,00	-0,20	Negativo
10 (PE)	2,60	2,50	3,90	3,00	1,30	0,50	-0,80	Negativo
11 (PE)	2,70	2,60	4,20	3,50	1,50	0,90	-0,60	Negativo
12 (PE)	2,70	2,90	5,90	5,10	3,20	2,20	-1,00	Negativo
13 (PE)	2,70	2,50	7,20	4,70	4,50	2,20	-2,30	Negativo
14 (PE)	3,10	3,10	5,10	3,60	2,00	0,50	-1,50	Negativo
15 (PE)	2,90	2,90	5,70	3,90	2,80	1,00	-1,80	Negativo
16 (PE)	2,40	2,80	5,90	5,60	3,50	2,80	-0,70	Negativo
10 (PB)	#	#	#	#	7,00	1,00	-6,00	Negativo
80 (PR)	5,20	5,30	8,90	7,10	3,70	1,80	-1,90	Negativo
106 (PR)	4,20	4,20	5,70	5,20	1,50	1,00	-0,50	Negativo
5 (PR)	5,40	5,70	7,40	7,30	2,00	1,60	-0,40	Negativo
163 (MG)	3,10	2,80	4,10	3,50	1,00	0,70	-0,30	Negativo
21 (MG)	2,70	3,50	4,40	4,40	1,70	0,90	-0,80	Negativo
3 (PE)	2,90	3,00	4,90	3,00	2,00	0	-2,00	Negativo
4 (PE)	4,50	3,20	5,00	3,90	0,50	0,70	0,20	Negativo
5 (PE)	3,90	3,00	4,10	4,20	0,20	1,20	1,00	Negativo
6 (PE)	3,90	2,70	5,30	3,80	1,40	1,10	-0,30	Negativo
7 (PE)	3,40	3,10	4,70	4,10	1,30	1,00	-0,30	Negativo
8 (PE)	3,50	3,20	5,30	3,70	1,80	0,50	-1,30	Negativo
9 (PE)	2,70	2,80	3,90	3,80	1,20	1,00	-0,20	Negativo
10 (PE)	2,60	2,50	3,90	3,00	1,30	0,50	-0,80	Negativo
11 (PE)	2,70	2,60	4,20	3,50	1,50	0,90	-0,60	Negativo

PPDa.: valor de espessura de pele no ponto de inoculação de tuberculina aviária

PPDb.: valor de espessura de pele no ponto de inoculação de tuberculina mamífera

 Δ Av: diferença de espessura de pele resultante da aplicação de PPDa. Δ Bv: diferença de espessura de pele resultante da aplicação de PPDb. Δ Bv- Δ Av: valor final obtido no Teste Cervical Comparativo (TCC)

Inconcl.: inconclusivo

#: valores de espessura de pele não informados