

FERNANDA CAVALLINI CYRILLO

**Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos
(*Ovis aries*)**

São Paulo
2006

FERNANDA CAVALLINI CYRILLO

**Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos
(*Ovis aries*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Fernando José Benesi

São Paulo
2006

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

8/10
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
14/11/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1789
FMVZ

Cyrillo, Fernanda Cavallini

Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos
(*Ovis aries*) / Fernanda Cavallini Cyrillo. – São Paulo: F. C.
Cyrillo, 2006.

92 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Clínica Médica, 2006.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Benesi.

1. Tuberculose. 2. Tuberculina PPD. 3. Ovinos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

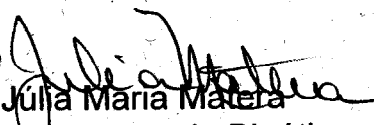
Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos (*Ovis aries*)", protocolo nº637/2005, utilizando 30 ovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando José Benesi, 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 "Standardization of tuberculin skin reaction in sheep (*Ovis aries*)", protocol number 637/2005, utilizing 30 sheep, under the responsibility of Prof. Dr. Fernando José Benesi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 31 de março de 2005


Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CYRILLO, Fernanda Cavallini

Título: Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos (*Ovis aries*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a 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: _____

Correr atrás de um sonho e vê-lo tornar-se realidade, faz transbordar um sentimento inigualável.

A **Deus**, pela sua
grandiosidade,
poder e sabedoria.

Aos meus pais, **Francisco** e **Denise**, ao meu irmão, **Luciano** e minha cunhada **Juliana**, pelo amor, convívio e apoio incondicional.

Ao meu noivo **Rodrigo**, pelo carinho, amor e paciência, em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Fernando José Benesi**, pelo voto de confiança depositado e pela forma com que conduziu e orientou este trabalho, meu muito obrigado.

À Profa. Dra. **Alice Maria Melville Paiva Della Libera**, agradeço por tudo que fez e ainda faz, incentivando e apoiando-me ao longo da Pós-Graduação.

Aos Profs. Dr. **Eduardo Harry Birgel Júnior**, Dr. **Idécio Luís Senhorini**, Dr. **Silvio Arruda Vasconcellos**, Dr. **José Antonio Visintin** e Dra. **Sônia Regina Pinheiro**, pela colaboração e auxílio neste projeto.

Aos Professores do Departamento de Clínica Médica, Dra. **Maria Claudia A. S. Magalhães**, Dra. **Lilian Gregory**, Dra. **Raquel Y. A. Baccarim** e Dr. **Wanderley Pereira de Araújo**, pelo apoio e ensinamentos.

À grande amiga **Marta Lizandra do Rêgo Leal**, pela confiança, apoio, ajuda, amizade e companheirismo, muito obrigado!

À grande amiga **Raquel Fraga da Silva Raimondo**, por todos os dias de muita coca cola, e chocolate, pela amizade, companheirismo, por estar ao meu lado nos momentos difíceis, pela mão amiga e ombro companheiro, sempre me dando força. “não reclama que podia ser pior”. Obrigada!

À grande amiga **Camila Rocha**, por todos os bons momentos vividos, risadas, viagens, companheirismo e cumplicidade, meus sinceros agradecimentos.

Às grandes amigas de longa data **Tatiana Peloia**, **Lílian Knobel**, **Vanessa Hirosse**, **Ligya de Barros** e **Larissa Beja** por todos os dias em que passamos juntas, pelos momentos de descontração e diversão, por sempre estarem ao meu lado nos momentos alegres e tristes.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação: **Alexandre, Ana Paula, Antonio, Bárbara, Barreto, Daniella, Elizabeth, Elisa, Fabio, Flavio, João Paulo, Maiara, Mariana, Milton Ricardo, Regiane e Rogério** pela boa convivência e amizade.

Aos Residentes do Hospital de Ruminantes - CPDER: **Frederico, Enoch e Thales** pelas ajudas prestadas.

À **Marli**, pela grande ajuda e treinamento laboratorial.

À **Clara**, pela ótima convivência, amizade e auxílio nos laboratórios.

À dona **Carmen**, pela paciência e dedicação com que cuidou dos materiais utilizados no laboratório.

À **Adelaide, Patrícia e Cida** pelo convívio e auxílio prestados.

Aos funcionários do Hospital Veterinário (CEPDER) da FMVZ-USP, pela gentileza e manutenção dos animais utilizados neste experimento, em especial ao **Luizinho** que sempre me ajudou quando necessário.

À Dra. **Eliana Roxo**, pela ajuda e fornecimento de material para executar este projeto.

Ao **Pedro Mota** do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela concessão das cepas de *M. avium* e *M. bovis* para a sensibilização dos animais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa para realização do curso de Mestrado.

RESUMO

CYRILLO, F. C. **Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos** (*Ovis aries*). [Standardization of tuberculin skin reaction in ovines (*Ovis aries*)]. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A inexistência de padrões nacionais para a realização e interpretação da prova de tuberculina em ovinos motivou o presente trabalho, pois apesar da tuberculose não estar incluída em Plano Nacional de Controle e Erradicação em pequenos ruminantes, estabelece a legislação vigente que é obrigatório o sacrifício de animais com essa zoonose, sendo o diagnóstico firmado nesses animais principalmente através do alérgoteste tuberculínico. Assim, esta pesquisa visou além de avaliar reações clínicas provocadas pela resposta imuno-alérgica intradérmica à tuberculina, estabelecer valores de referência para a interpretação da reação em ovinos experimentalmente inoculados com antígenos de cepas padrões de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*. Utilizou-se 30 ovinos, clinicamente saudáveis, negativos à prova de tuberculina cervical comparativa (TCC), segundo critérios estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) em bovinos e bubalinos, distribuídos por três grupos de 10 animais cada, a saber: **A** - sensibilizados com *M. avium*; **B** - sensibilizados com *M. bovis* e **C** (Controle) - que receberam injeção de solução fisiológica. Os ovinos foram monitorados através de exames físicos e complementares semanais. Após 45 dias da sensibilização, realizou-se a prova de TCC com reação medida pela variação da espessura da pele com cutímetro de mola, nos seguintes momentos: antes da aplicação das tuberculinas (PPDs); 12h, 24h, 48h, 72h e 96h após a aplicação das mesmas. Em

relação à reação ao PPD bovino, no teste cervical simples, lido às 72 horas (\pm 6 horas) pós-tuberculinização (p. t.), considerou-se uma reação como **positiva**, quando o aumento da espessura da pele foi igual ou maior que 2,49 mm; como **inconclusiva**, com as medidas de aumento entre 1,00 e 2,48 mm, e como reação **negativa**, aumentos da espessura da pele inferiores a 1,00 mm, sendo estes valores propostos como padrão para o teste intradérmico simples na região cervical. A análise dos resultados da leitura do teste cervical comparativo, realizada às 72 horas (\pm 6 horas) p. t., permitiu concluir-se que o animal poderá ser considerado com resposta: **positiva**, quando a reação ao PPD bovino superar aquela ao aviário em pelo menos 2,00 mm; **inconclusiva**, quando a reação ao PPD bovino for maior que aquela ao aviário, com diferença entre 1,00 e 1,99 mm, e **negativa** quando a reação bovina for menor que a aviária ou $>$ em até 0,99 mm. Na avaliação histológica das respostas tuberculínicas homólogas, 96 horas após a injeção do PPD, constatou-se a presença de moderado a intenso infiltrado inflamatória, constituído, preferencialmente, por células mononucleares.

Palavras-chave: Tuberculose. Tuberculina PPD. Ovinos.

ABSTRACT

CYRILLO, F. C. **Standardization of tuberculin skin reaction in sheep** (*Ovis aries*). [Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos (*Ovis aries*)]. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The inexistence of national patterns for the realization and interpretation of tuberculin test in sheep motivated this research. Although tuberculosis is not included in the National Plan for the Control and Eradication in small ruminants, the current legislation has made it mandatory the sacrifice of animals with this zoonosis, where diagnosis is confirmed principally by the usage of the tuberculin skin reaction. Therefore, this study evaluated the clinical manifestations induced by the intradermic immune-allergic response to tuberculin, and established the reference values for the interpretation of this reaction in sheep experimentally inoculated with antigens of recognized strains of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*. Thirty healthy sheep negative to the Comparative Cervical Tuberculin Test (CCT) based on criteria established by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) in the National Plan for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis in cattle and buffalos were used during this experiment. Animals were separated in three groups: A) sensitized with *M. avium*, $n=10$; B) sensitized with *M. bovis*, $n=10$; and C) control, $n=10$, which were injected with saline solution. Sheep were monitored by weekly clinical and complementary exams. After 45 days of inoculation the CCT was evaluated by the variation of dermal thickness determined by a pakimeter realized in the following moments: before the administration of tuberculin (PPD); and 12, 48, 72, and 96 hours after administration of inoculation. Relative to the bovine PPD, the simple cervical test, observed at 72 hours (± 6 hours) post-tuberculinization (p.t.) was considered as: **positive**, when skin fold thickness was equal or greater than 2.49 mm; **inconclusive**, skin fold thickness between 1 and 2,48 mm; and **negative**, when

thickness was lower than 1 mm; these values being proposed as reference values for the simple intradermic cervical test. Analyses of the results of the comparative cervical tests realized 72 hr (\pm 6 hr) p.t. concluded that the animal was considered as: **positive**, when the bovine PPD reaction was greater than that of the avian by at least 2 mm; and **negative**, when the bovine reaction was less than the avian or $>$ by 0.99 mm. Histological evaluation of the homologous tuberculin response 96 hr after PPD injection, revealed a moderate to intense inflammatory cellular influx, constituted preferentially, of mononuclear cells.

key Words: Tuberculosis. Tuberculin (PPD). Sheep.

LISTA DE QUADRO

- Quadro 1 – Valores de referência do Teste cervical comparativo utilizados pelo PNCEBT, para o controle da tuberculose em bovinos (MAPA, 2004)..... 52
- Quadro 2 – Ovinos submetidos ao teste cervical comparativo para o diagnóstico da tuberculose, conforme o número de identificação do animal, o grupo experimental a que pertenciam (A – sensibilizado por *M. avium*; B – sensibilizado por *M. bovis* e C – controle, não sensibilizado), o sexo (M – masculino e F – feminino) e a raça - São Paulo – 2006..... 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Espessura da pele (mm), na região cervical, de ovinos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão de *M. avium*, conforme o grupo, o número de identificação, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicado e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária - São Paulo - 2006..... 59
- Tabela 2 - Espessura da pele (mm), na região cervical, de ovinos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão de *M. bovis*, conforme o grupo, o número de identificação, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicado e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária - São Paulo - 2006..... 60
- Tabela 3 - Espessura da pele (mm), na região cervical, de ovinos não sensibilizados que receberam injeção de solução fisiológica (0,9 % NaCl), conforme o grupo, o número de identificação, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicado e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária - São Paulo - 2006..... 61
- Tabela 4 - Valores médios gerais dos aumentos de espessura da pele (mm) dos ovinos, obtidos das medidas de todos os momentos das leituras, induzidos pelos PPD B (bovino) e PPD A (aviário), aplicados na região cervical, segundo os grupos experimentais de caprinos - São Paulo - 2006..... 62
- Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão (mm) dos aumentos de espessura da pele de ovinos, induzidos pelo PPD aviário, aplicados na região cervical, segundo os grupos experimentais e os momentos da leitura dos resultados - São Paulo - 2006..... 64
- Tabela 6 - Valores médios e desvios padrão (mm) dos aumentos de espessura da pele de ovinos, induzidos pelo PPD bovino, aplicado na região cervical, segundo os grupos experimentais e os momentos da leitura dos resultados - São Paulo - 2006..... 65
- Tabela 7 - Resultados das diferenças (mm) entre a intensidade de reação aos PPD bovino e aviário, em ovinos submetidos ao teste cervical comparativo, segundo os grupos experimentais e o momento da leitura dos resultados. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão - São Paulo - 2006..... 66

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Valores médios do aumento de espessura da pele em milímetros, obtidos no teste cervical comparativo, induzido pelos PPD B (bovino) e PPD A (aviário), conforme os grupos experimentais de ovinos (Grupo A – sensibilizado com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis* e Grupo C – não sensibilizado/ controle) - São Paulo 2006..... 63
- Gráfico 2 - Valores médios da espessura da pele de ovinos, medidos em milímetros, no local de aplicação do PPD aviário, conforme os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizado com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis* e Grupo C – não sensibilizado/ controle) e o momento da leitura do resultado do teste cervical comparativo - São Paulo - 2006..... 64
- Gráfico 3 - Valores médios da espessura da pele de ovinos, medidos em milímetros, no local de aplicação do PPD bovino, conforme os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizado com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis* e Grupo C – não sensibilizado/ controle) e o momento da leitura dos resultados do teste cervical comparativo - São Paulo - 2006..... 65
- Gráfico 4 - Valores médios da diferença entre a espessura da pele de ovinos, medidas nos locais de reação ao PPD bovino e aviário, em milímetros, conforme os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizado com *M. avium*; Grupo B – sensibilizado com *M. bovis* e Grupo C – não sensibilizado/ controle) e o momento da leitura do resultado do teste cervical comparativo - São Paulo - 2006..... 67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal controle, antes da injeção das tuberculinas. Notar a ausência de alterações histopatológicas. HE. 69
- Figura 2 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal controle, no local de aplicação do PPD aviário, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a ausência de infiltrado inflamatório. HE..... 70
- Figura 3 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal controle, no local de aplicação do PPD bovino, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a ausência de infiltrado inflamatório. HE..... 70
- Figura 4 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal sensibilizado com *M. avium*, no local de aplicação do PPD aviário, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a presença de intenso infiltrado inflamatório, constituído, preferencialmente, por células mononucleares. HE..... 71
- Figura 5 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal sensibilizado com *M. avium*, no local de aplicação do PPD bovino, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a presença discreta de células inflamatórias mononucleares. HE..... 71
- Figura 6 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal sensibilizado com *M. bovis*, no local de aplicação do PPD aviário, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a presença discreta de células inflamatórias mononucleares. HE..... 72
- Figura 7 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal sensibilizado com *M. bovis*, no local de aplicação do PPD bovino, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a presença de intenso infiltrado inflamatório, constituído, preferencialmente, por células mononucleares. HE..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FAO – Food and Alimentation Organization, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

OMS – Organização Mundial de saúde

HCSM – Heat Concentrated sintetic médium, tuberculina sintética concentrada pelo calor

HE – Hematoxilina-Eosina

HOVET – Hospital Veterinário

hs – horas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LARA-MAPA – Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PNCEBT – Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose.

PESCO – Plano Estadual de Sanidade de Caprinos e Ovinos.

> maior; < menor; ≥ maior ou igual; ≤ menor ou igual

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

NaCl – Cloreto de Sódio

OT – Old Tuberculin, tuberculina velha de Koch

% - porcentagem

PPD – Purified Protein Derivative, derivado protéico purificado

PPD A – tuberculina aviária

PPD B – tuberculina bovina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1	IMPORTÂNCIA DA OVINOCULTURA.....	26
2.2	HISTÓRICO DA TUBERCULOSE OVINA.....	27
2.3	ETIOPATOGENIA.....	31
2.4	SINTOMATOLOGIA.....	35
2.5	DIAGNÓSTICO.....	37
2.6	CONTROLE E PROFILAXIA.....	40
2.7	TESTE TUBERCULÍNICO.....	44
2.7.1	TUBERCULINAS.....	44
2.7.2	REAÇÃO TUBERCULÍNICA.....	45
2.7.3	TESTES TUBERCULÍNICOS UTILIZADOS.....	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	ANIMAIS.....	51
3.2	EXAME FÍSICO.....	51
3.3	TESTE TUBERCULÍNICO SEGUNDO O PNCEBT.....	52
3.3	SENSIBILIZANTES.....	53
3.4	SENSIBILIZAÇÃO.....	53
3.5	TUBERCULINIZAÇÃO.....	54
3.6	AMOSTRA DE PELE.....	55
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	56
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4	RESULTADOS	58

4.1	TESTE IMUNO-ALÉRGICO CUTÂNEO.....	58
4.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	69
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose tem prevalência cosmopolita, causando grandes danos à pecuária e aos seres humanos consumidores de produtos de origem animal contaminados pelo seu agente causador (LILENBAUM, 2000). Os animais domésticos, quando acometidos pela tuberculose, são considerados reservatórios e disseminadores da doença aos homens, representando um risco à saúde pública (ANTUNES et al., 2002; LUKE, 1958).

O consumo de leite bovino é um meio importante de transmissão da tuberculose, embora apenas 1% das vacas diagnosticadas como positivas para a doença secretem o agente da infecção no período de lactação (ANTUNES et al., 2002; GRANGE; YATES, 1994; SEVA et al., 2002). No início do século passado, antes do desenvolvimento da tecnologia para a pasteurização do leite, a frequência da infecção em crianças pelo *M. bovis* era muito elevada, devido à ingestão de leite cru (CORRÊA, 1975; GRANGE; YATES, 1994).

Em 2001, foi lançado, no Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) cujo objetivo é diminuir a prevalência e a incidência de novos casos dessas enfermidades, além de erradicá-las, identificando propriedades livres, incentivando a participação por meio da certificação daquelas que oferecem ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (MAPA, 2004), promovendo dessa forma uma maior competitividade da pecuária nacional através do aumento da qualidade dos produtos de origem animal oferecidos no mercado (SANTOS, 2006).

Em relação aos rebanhos de ovinos e caprinos, no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), enviou para licitação pública o

Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) pela Portaria SDA nº 103, de 7 de dezembro de 2004. Nesta licitação a tuberculose não foi considerada como doença a ser combatida, pois não é reconhecida a sua incidência nessas espécies animais, não se justificando, portanto, a implantação de medidas específicas, visando o controle sistemático dessa doença nesses pequenos ruminantes (MAPA, 2004). Contudo, no Brasil, a tuberculose tem sido diagnosticada em animais dessas espécies, registrando-se caprino com tuberculose atendido na Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Este caso, diagnosticado em 2001, desencadeou pesquisas em caprinos e ovinos com objetivo de avaliar a ocorrência desta enfermidade nos pequenos ruminantes, até então considerados como espécimes resistentes à tuberculose (BENESI et al., 2006; SILVA et al., 2006).

A pecuária destinada à criação de ovinos vem se expandindo há muito tempo e diversificando a sua exploração. Em condições criatórias brasileiras, antigamente os ovinos eram utilizados apenas para a subsistência familiar, particularmente para produção de lã e carne (BRITO, 2004). Com a evolução da seleção genética e o desenvolvimento tecnológico percebeu-se que esta espécie poderia ser uma fonte valiosa de renda, não só pela comercialização de seus produtos tradicionais, mas também pela venda do leite e de subprodutos deste (BENCINI; PULINA, 1997; BRITO et al., 2006; PEETERS et al., 1992).

No Brasil, o rebanho de ovinos vem apresentando um comportamento numérico relativamente estável, contando com cerca de 14,7 milhões de cabeças desde 1996, o que representa 8% do total de animais ruminantes criados no país

(FAO, 2004), distribuído de forma concentrada nas regiões nordeste (49%) e sul (40%) (VASCONCELOS; VIEIRA, 2002).

O sistema brasileiro de produção tem grande potencial para superar os demais países latino-americanos produtores de carne ovina. Fator favorecedor desta perspectiva é a crescente demanda por produtos ovinos no país. Os empresários ligados a bovinocultura demonstram interesse em investir em uma nova fonte de exploração pecuária, enfatizando-se a ovinocultura e a caprinocultura (SANTOS, 2006).

A legislação nacional pertinente ao Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO) ainda não está concluída para implantação, mas já existe, por parte dos criadores e técnicos da área, a solicitação de que a tuberculose seja inserida no programa. Esta inserção ressaltaria a necessidade de se determinar os valores de referência para o teste de tuberculina em ovinos como ferramenta de programa específico para combate e erradicação da tuberculose nessa espécie animal.

O Decreto 45.781 de 27 de abril de 2001, que regulamenta a defesa sanitária animal, em seu Artigo 5º reza prevenir, combater, controlar, erradicar e sacrificar animais atacados por zoonoses, entre elas a tuberculose, cuja base diagnóstica é a avaliação por meio do alérgoteste da tuberculina (MAPA, 2004; PGESP, 2006), não havendo no entanto, padrões estabelecidos para ovinos em condições criatórias brasileiras.

Diante da importância do tema, a precariedade de dados nacionais sobre a doença em ovinos; a necessidade de aprofundamento nas técnicas de diagnóstico pertinente ao combate e erradicação da doença, dando continuidade a uma linha de pesquisa implantada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, no

Departamento de Clínica Médica, que foi iniciada com o estudo em caprinos, este trabalho foi delineado pretendendo avaliar a resposta imuno-alérgica cutânea à tuberculina em ovinos (*Ovis aries*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A tuberculose é uma doença considerada rara na espécie ovina. Conforme alguns estudiosos, particularmente da Europa, Continente detentor de grande parte do rebanho mundial de ovinos, existem evidências que contestam a raridade dessa enfermidade, razão pela qual serão discutidas no decorrer deste trabalho.

2.1 IMPORTÂNCIA DA OVINOCULTURA

A ovinocultura está presente em quase todos os países do mundo, com criação de aproximadamente 800 raças distintas, utilizando-se de sistemas de manejo variado e adequado as mais diversas condições ambientais (FAO, 2004).

A produção mundial de carne ovina gira em torno de 12,8 milhões de toneladas, verificando-se que a grande concentração do rebanho mundial ovino está distribuída por 10 países, detentores de 60% do total da criação (IBGE, 2004).

Segundo dados obtidos em 1995 pela Food and Agriculture Organization United Nations (FAO), a produção brasileira de carne ovina alcançava cerca de 84 mil toneladas por ano e com maior parcela desta originada do Rio Grande do Sul (FAO, 2004). Dados atuais indicam que a produção brasileira de carne ovina representa 1% da mundial, proporção que também vem se mantendo relativamente constante desde de 1995 (IBGE, 2004).

No que se refere ao consumo de carne ovina, estimava-se na década de 90, que cada brasileiro consumia apenas 250 gramas anualmente, enquanto na

Argentina o consumo “per capita” era de 2,5 quilos ao ano, e no Uruguai este consumo era ainda maior, cerca de 16 kg/ano (FAO, 2004).

Considerando-se assim às condições favoráveis à criação ovina em nosso país, em conjugação ao consumo ainda muito baixo de sua carne, mas que pode ser expandido à semelhança de mercados como os da Argentina e Uruguai, acredita-se que a ovinocultura possa vir a ser uma atividade com grande importância sócio-econômica (VASCONCELOS; VIEIRA, 2002), justificando-se, todos os esforços para otimizar-se o desfrute dessa criação.

2.2 HISTÓRICO DA TUBERCULOSE OVINA

A tuberculose em ovinos vem sendo descrita na Inglaterra desde 1867, em rebanhos que conviviam com bovinos. Em 1873, a doença foi relatada em um cordeiro alimentado com leite bovino, o qual apresentava lesões características de tuberculose. Esta constatação foi comprovada por meio do exame *pós mortem* identificando lesões tuberculosas na carcaça dos ovinos acometidos (CARMICHAEL, 1938).

Esses registros antecederam a descoberta realizada por Robert Koch em 1882, que através da realização de análises laboratoriais identificou e isolou o agente da tuberculose em humanos (KOCH, 1932). Tal fato motivou pesquisas para confirmar a existência da enfermidade nos animais domésticos, levando à identificação dos bovinos como importante fonte de transmissão da doença para seres humanos, através do consumo do leite cru (CORRÊA, 1975; GRANGE; YATES, 1994). As demais espécies animais também passaram a ser consideradas

como fontes importantes de infecções e transmissões da tuberculose ao homem (CORRIN et al., 1987; MURPHY, 1935).

Em 1900 e 1902, na Inglaterra, foram identificados novos casos de tuberculose ovina por meio de análises laboratoriais, sendo estes os primeiros casos confirmados da enfermidade nessa espécie animal (M'FADYEAN, 1900; 1902). Foulerton (1902) ao realizar necropsia em ovino observou lesões generalizadas, sugerindo tratar-se de mais um caso de tuberculose nessa espécie, confirmando os achados anteriores.

Em 1925, após levantamento de casos de tuberculose ocorridos na Inglaterra, identificou-se dois ovinos infectados pelo *Mycobacterium avium* (GRIFFITH, 1925).

Apesar dessa aparente raridade da enfermidade, outros casos foram relatados a seguir, destacando-se ocorrência na Escócia, de dois ovinos que apresentaram lesões tuberculosas generalizadas (JOWETT, 1928). Na Irlanda, em 1935, foi identificado através de análises laboratoriais o bacilo do *Mycobacterium bovis*, em lesões encontradas em diversos órgãos de um ovino, sendo este o primeiro caso de tuberculose na espécie ovina comprovado no país (MURPHY, 1935).

No Marrocos, Mouquet¹ (1918 apud CARMICHAEL, 1938, p.1139) relatou casos de ovinos selvagens com lesões tuberculosas, causadas pela infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, todavia sem a realização de comprovação laboratorial que confirmasse a suspeita dessa enfermidade. Acreditava-se que a possível fonte de infecção para o contágio destes animais era representada por tratadores doentes.

¹ Mouquet(1918). Deux Autopsies de Mouflons. Tuberculosae.Bull.Soc.Med.Vét.1918. 162-166.

Em 1922, o Serviço de Inspeção Federal de carne dos Estados Unidos da América (EUA), após inspecionar 12 milhões de carcaças ovinas, verificou em sete delas lesões características de tuberculose. Tal frequência de constatação levou esse serviço a acreditar em uma possível resistência dos ovinos às infecções causadas pelo agente da tuberculose (EDELMAN; MOHLER; EICHHORN¹, 1925 apud CARMICHAEL, 1938, p. 1139). As estatísticas desse serviço, entre 1958 e 1963, evidenciaram ausência de carcaças ovinas condenadas por tuberculose (MARSH, 1965).

Finalmente cabe mencionar que no Brasil, inexitem informações sobre a tuberculose ovina, todavia na região de São Paulo, em 2004, no Hospital Veterinário – Serviço de Clínica de bovinos e pequenos ruminantes da FMVZ/USP, há o registro de um ovino que no exame *pós mortem* apresentou lesões sugestivas de tuberculose. No material enviado para análise laboratorial, constatou-se a infecção determinada pelo bacilo do *Mycobacterium tuberculosis* (Informação Verbal)².

Resumindo-se este histórico, sobre a controvérsia que envolve a importância da tuberculose ovina, de um lado temos M'Fadyean (1900) e Cordes et al. (1981), que afirmavam que esta doença sempre esteve presente nos ovinos, porém com pequeno número de relatos proporcionalmente à grande prevalência da enfermidade nos bovinos. Outros autores se referem ao tipo de manejo como um dos fatores determinantes da baixa frequência da doença na espécie ovina (ALLEN, 1988; COLLEMAN; COOKE, 2001; FOULERTON, 1902; GRIFFITH, 1928). Jensen e Swift (1982), propunham que os animais doentes surgiam muitas vezes no início do inverno, quando eram recolhidos para confinamento, sendo submetidos a higiene inadequada.

¹ Edelman, Mohler and Eichhorn (1925). Meat Hygiene. 5th ed. 296. J. & H. Churchill, Ltd., London.

² Informação fornecida por Benesi, F.J em 2006.

Adicionalmente, os relatos de baixa ocorrência de tuberculose e a suposta resistência dos ovinos à infecção causada pelo *M. bovis*, *M. avium* e *M. tuberculosis* (ALLEN, 1988; CRAIG; DAVIES, 1938; FELDMAN; BAGGENSTOSS, 1938; FRANCIS, 1958; HIEPE, 1972; KUMMENEJE; FODSTAD, 1976; LUKE, 1958), poderiam ser atribuídos a outras enfermidades mais comuns, que acometem os ovinos, justificando-se assim, que países como Nova Zelândia, Inglaterra, EUA, Marrocos e Irlanda identificassem poucos casos de tuberculose na espécie ovina, tornando-se necessário o diagnóstico diferencial preciso para a tuberculose (ALLEN, 1988; HARSHFIELD; RODERICK; HAWN, 1937).

É exemplo deste fato, a linfadenite caseosa, causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que é uma das enfermidades que mais facilmente pode ser confundida com a tuberculose (BAIRD; SYNGE; DERCKSEN, 2004; LANGENEGGER; LANGENEGGER; SCHERER, 1991), pois suas lesões são muito semelhantes às encontradas em animais infectados pelo *M. bovis* (ALLEN, 1988; BARTON; ACLAND, 1973; HARSHFIELD; RODERICK; HAWN, 1937).

A resistência dos ovinos à infecção tuberculosa é facilmente refutada por pesquisadores que conseguiram infectar ovinos experimentalmente, tanto por inoculação parenteral como pela via digestiva, por meio da ingestão de alimentos contaminados pela micobactéria, evidenciando-se a susceptibilidade dos ovinos à infecção (BARTON; ACLAND, 1973; FOULERTON, 1902; M'FADYEAN, 1902).

Hiepe (1972), com base em dados estatísticos colhidos em matadouros da Alemanha e dos Estados Unidos, verificou uma prevalência por volta de 0,0002% a 0,35% de tuberculose nos ovinos inspecionados. Adicionalmente, levantamentos realizados na Nova Zelândia permitiram verificar que apenas 0,05% dos ovinos

estudados em matadouros apresentavam as lesões sugestivas de tuberculose (ALLEN, 1988).

A revisão do histórico da tuberculose em ovinos destaca a controvérsia sobre a raridade desta zoonose nesta espécie, todavia não deixa dúvidas que a doença os acomete. Na medida em que a utilização dos ovinos para produção leiteira se intensificar, haverá a necessidade do diagnóstico da tuberculose nessa espécie animal com sua inclusão em programas como PNCEBT, Programa Estadual de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PESCO) e Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO), estabelecendo-se normas para notificação da doença, viabilizando e facilitando o comércio nacional e internacional de produtos. Nesse sentido, destaca-se a importância da padronização de técnicas para diagnóstico da enfermidade nos ovinos, objeto do presente trabalho.

2.3 ETIOPATOGENIA

A tuberculose nos animais pode ser causada pelo *Mycobacterium bovis* e pelo *Mycobacterium tuberculosis*, tendo diferentes características de cultura e patogenicidade (RADOSTITIS et al., 2002; ROBINSON, 1983; SMITH, 2006; THOEN, 1988).

A micobactéria é um agente pleomórfico, aeróbico, imóvel, não formador de esporos, que mede em torno de 1,5 a 4 x 0,2 a 0,6 µm. São bacilos ácido resistentes (“acid fast bacilli”) e gram positivos (CORDES et al., 1981; HIPOLITO; FREITAS; FIGUEIREDO, 1965; JENSEN; SWIFT, 1982; STUBBS; LIVE, 1939). O *Mycobacterium bovis* quando submetido a temperatura, umidade, pH e exposição

aos raios solares favoráveis pode sobreviver por longos períodos no solo e pastagens (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994; RADOSTITIS et al., 2002). O agente tem moderada resistência à dessecação e desinfetantes, morrendo em até duas horas quando exposto à luz solar, e no leite, aquecido a 70°C morre em 5 minutos (HIEPE, 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; RADOSTITIS et al., 2002).

Esta bactéria é constituída por uma parede espessa dupla, sendo a camada superficial uma cápsula difusa, tendo uma membrana plasmática auxilia o organismo a sobreviver em ambientes não favoráveis. A parede celular é constituída por uma estrutura química complexa, incluindo os peptidoglicanos, arabinogalactanos, ácidos micólicos, e na estrutura superficial, diversos lipídeos, entre eles os micosídeos, fator corda, cera D, sulfolipídeos e glicolipídeos (PRITCHARD, 1988).

Os ovinos apresentam susceptibilidade a infecção semelhante aos bovinos e cervos, podendo, portanto apresentar infecções similares à causada pelo *Mycobacterium spp*, ou seja, a prevalência da enfermidade deveria ser considerada equiparável (LISLE et al., 1983; MACKINTOSH et al., 2004). Allen (1988) sugeriu que a prevalência da infecção nos ovinos deveria ser a mesma daquela presente nos bovinos. A tuberculose pode acometer ovinos de todas as raças e sexos, com idades variáveis (JENSEN; SWIFT, 1982).

Os ovinos demonstram uma maior resistência frente a uma infecção causada pelo *M. bovis* (RADOSTITIS et al., 2002; SMITH, 2006), sendo, no entanto este agente considerado o mais importante nas infecções dos ovinos, baseado nos relatos de prevalência da tuberculose na espécie (HARSHFIELD; RODERICK, 1934; HIEPE, 1972; ROBINSON, 1983; THOEN, 1988). Alguns pesquisadores consideravam os ovinos mais suscetíveis às infecções causadas pelo *M. avium* (BARTON; ACLAND, 1973; CREECH, 1940; GRIFFITH, 1925; KUMMENEJE;

FODSTAD, 1976; LUKE, 1958). Hiepe (1972) e Fritsche et al. (2004), todavia, descreviam a resistência dos ovinos à infecção causada pelo *M. tuberculosis*, porém não descartavam a possibilidade de eventual infecção.

Esses agentes ganham o sistema orgânico em dois estágios: o complexo primário e o pós-primário. O complexo primário consiste na associação da lesão do ponto de entrada e aquela no linfonodo regional (brônquicos, mediastínicos, faríngeos, mesentéricos), ocorrendo a infecção na maioria das vezes por inalação do agente. As lesões desse complexo são encontradas calcificadas e com presença de focos necróticos circundadas por tecido de granulação que contém células mononucleares (HUTYRA; MAREK; MANNINGER, 1968; NEILL et al., 1994; RADOSTITIS et al., 2002; SMITH, 2006).

Na seqüência ocorre a disseminação pós-primária do agente para os órgãos, podendo ocorrer a tuberculose miliar difusa, que consiste em lesões nodulares discretas principalmente nos pulmões, fígado, baço e intestinos, ou a tuberculose crônica, causada por re-infecção endógena e/ou exógena de tecidos sensibilizados pela tubérculo-proteína. Os sintomas da tuberculose são progressivos e variam conforme o local da infecção, porém pode associar-se a quadros de toxemia e debilidade, seguidos por morte (JENSEN; SWIFT, 1982; RADOSTITIS et al., 2002; SMITH, 2006).

A fonte de infecção para os ovinos acredita-se ser representada por animais infectados, destacando principalmente os bovinos e os ruminantes silvestres, entre eles, cervos, texugos, gambás. Estes animais atuam como reservatórios e disseminadores da tuberculose, dificultando a erradicação da enfermidade nas fazendas, representando também um risco aos seres humanos (AYELE et al., 2004;

HUTYRA; MAREK; MANNINGER, 1968; CORDES et al., 1981; JENSEN; SWIFT, 1982; KANTOR; RITACCO, 1994; LUKE, 1958).

O agente da tuberculose pode ser encontrado em aerossóis exalados, esputo, fezes, leite, urina, secreção vaginal, sêmen e exudatos drenados de linfonodos (ALLEN, 1988; HIPOLITO; FREITAS; FIGUEIREDO, 1965; JENSEN; SWIFT, 1982; SMITH, 2006; WHITING; TESSARO, 1994). Um grande número de bacilos é eliminado nas fezes, podendo estas permanecer infectadas por seis a oito semanas. Todavia, muitos pesquisadores não acreditam que as pastagens sejam uma fonte de infecção importante (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994; SMITH, 2006). A água parada contaminada pelo agente pode permanecer infectada por 18 dias, e as estabulações superpovoadas têm papel significativo na disseminação da doença (SMITH, 2006).

Os animais que se encontram nos estágios iniciais da enfermidade podem também produzir aerossóis infectantes, contrapondo-se o fato à crença daqueles que consideravam como disseminadores do *M. bovis*, apenas os animais com lesões pulmonares já estabelecidas (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994).

Os ovinos podem ainda adquirir a doença por meio de seres humanos enfermos, que eliminem o agente. Nos cordeiros a enfermidade pode ser contraída por meio da veia umbilical, devido a infecções uterinas. As infecções adquiridas pelo coito são raras, porém podem ocorrer, necessitando este assunto de estudos mais aprofundados (HIPOLITO; FREITAS; FIGUEIREDO, 1965; JENSEN; SWIFT, 1982).

As infecções por via hematogena ocorrem a partir de lesões primárias e secundárias, com a penetração do agente em diferentes órgãos, ocasionando-se um quadro de bacteremia e disseminação do mesmo através da corrente sanguínea. Quando provocadas experimentalmente por essa via, demonstram uma intensidade

ainda maior, com agravamento das lesões nos órgãos afetados (DAMMANN; MUSSEMELE¹, 1905 apud LUKE, 1958, p. 534; HIPOLITO; FREITAS; FIGUEIREDO, 1965; JENSEN; SWIFT, 1982). Com relação a infecção por via digestiva observou-se que a administração experimental de altas doses do agente promovia uma infecção generalizada, reforçando tal fato sua importância como via de transmissão (DAMMANN; MUSSEMELE¹, 1905 apud LUKE, 1958, p. 534). Ostertag² (1934 apud CARMICHAEL, 1938, p. 1140), já acreditava que o bacilo da tuberculose era transmitido aos ovinos pela ingestão de alimentos contaminados, não descartando a possibilidade de infecção por via respiratória.

A tuberculose é uma enfermidade distribuída mundialmente, sendo relatada na Inglaterra, Alemanha, EUA, Nova Zelândia, África, Irlanda e Brasil. A ocorrência da doença tem se mostrado preocupante em países considerados subdesenvolvidos e em desenvolvimento, devido a presença de problemas de desnutrição, moradias inadequadas e seres humanos portadores de doenças imunossupressoras (AYELE et al., 2004; GRANGE; YETES, 1994; JENSEN; SWIFT, 1982; LUKE, 1958).

2.4 SINTOMATOLOGIA

A tuberculose em ovinos é uma enfermidade insidiosa, progressiva e de caráter crônico, que apresenta evolução longa podendo se estender por muitos meses a anos (JENSEN; SWIFT, 1982). Os sintomas da infecção causada pelo *Mycobacterium bovis* são muito inespecíficos, de forma que podem ser muitas vezes

¹ Dammann Mussemeler (1905). Cited by Cobbett(1917). 423.

² Ostertag, Robert, V. (1934). A text-book of meat inspection, edited by T. Dunlop Young. English edition. Bailliere, Tindall & Cox, London

imperceptíveis em ovinos infectados. Devido a esse comportamento, os ovinos doentes tornam-se um risco à saúde dos demais animais e dos seres humanos (HIEPE, 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; SMITH, 2006; SMITH; SHERMAN, 1994).

Os sintomas evidenciados são: enfraquecimento gradual, emagrecimento crônico, debilidade, apetite caprichoso, tosse discreta, dificuldade respiratória e descarga nasal persistente (AYELE et al., 2004; HIEPE, 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; MARSH, 1965; PUGH, 2005; SMITH, 2006; SMITH; SHERMAN, 1994). Nos casos mais severos os ovinos apresentam febre, apatia, broncopneumonia grave, caquexia e em alguns casos timpanismo devido ao aumento dos linfonodos mediastínicos impedindo ou dificultando a eructação (HIEPE, 1972; MARSH, 1965; MARTIN; AITKEN, 2000; PUGH, 2005; RADOSTITIS et al., 2002; SMITH, 2006).

Os sintomas relacionados especificamente ao sistema respiratório são mais comuns, apresentando-se de forma variável, todavia os animais infectados apresentam uma tosse crônica e discreta, e uma dificuldade respiratória mais evidente quando as lesões atingem os lobos pulmonares e a pleura (HIEPE, 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; SMITH, 2006). Nos estágios terminais da enfermidade os ovinos podem apresentar ruídos pulmonares com presença de crepitação e sibilos, dispnéia ou taquipnéia (PUGH, 2005; SMITH, 2006). As úlceras intestinais e as diarréias também podem estar associadas aos quadros de tuberculose, evidenciando a via digestiva como porta de entrada do agente (MARSH, 1965; SMITH, 2006).

Em rebanhos acometidos pela tuberculose, é freqüente evidenciar-se pelo exame físico dos animais um menor número de ovinos acometidos do que daqueles reagentes à tuberculina e com resultados de necropsia evidenciando lesões

características da enfermidade (HIEPE, 1972; RADOSTITIS et al., 2002; SMITH, 2006).

2.5 DIAGNÓSTICO

A tuberculose de modo geral é difícil de ser diagnosticada exclusivamente através do exame físico, devido a sua natureza crônica e a multiplicidade dos linfonodos e órgãos que podem ser lesados tornando os sintomas inespecíficos (AYELE et al., 2004; JENSEN; SWIFT, 1982; RIET-CORRÊA et al., 2001). Assim sendo, o diagnóstico da tuberculose não deve ser baseado unicamente no exame físico para sua confirmação (HIEPE, 1972; RADOSTITIS et al., 2002), dependendo na maioria das vezes da realização do teste tuberculínico e também de análise de secreções para isolamento do agente, destacando-se que o alérgoteste além de auxiliar no exame clínico dos ovinos doentes (JENSEN; SWIFT, 1982; LUKE, 1958; MARSH, 1965), é a base diagnóstica utilizada nos Programas de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose em ruminantes (AYELE et al., 2004; MAPA, 2004; MONAGHAM et al., 1994).

A prova tuberculínica tem sido utilizada há muitos anos, para o diagnóstico da tuberculose em bovinos, caprinos e ovinos suspeitos de infecção causada pelo *Mycobacterium bovis* (JENSEN; SWIFT, 1982; LUKE, 1958; MARTIN; AITKEN, 2000). No entanto, em condições criatórias brasileiras os valores padrões específicos da prova tuberculínica para caprinos só foram estabelecidos recentemente (SILVA, 2004; SILVA et al., 2006), sendo até então utilizados os

padrões de interpretação dos resultados da prova estabelecidos para os bovinos, quando analisados os caprinos e ovinos (MAPA, 2004).

Pode ainda auxiliar o diagnóstico da tuberculose em ovinos a realização de análises necroscópicas, bacteriológicas, e histopatológica, além de reprodução da doença por inoculação do agente em cobaias (BARTON; ACLAND, 1973; CORDES et al., 1981; KUMMENEJE; FODSTAD, 1976; MARSH, 1965; STUBBS; LIVE, 1939; WHITTY; DEMPSEY, 1974).

A análise necroscópica é de grande auxílio, pois em muitos animais a confirmação do diagnóstico de tuberculose é realizada neste exame (MARSH, 1965), sendo as lesões da zoonose, similares àquelas verificadas em bovinos e caprinos doentes (FRANCIS, 1958; KUMMENEJE; FODSTAD, 1976; M'FADYEAN, 1900; RADOSTITIS et al., 2002; ROBINSON, 1983; SEVA et al., 2002; SMITH; SHERMAN, 1994). Na Nova Zelândia, Allen (1988) e Davidson, Alley e Beatson (1981) verificaram em ovinos abatidos lesões características de tuberculose nas carcaças, confirmadas pela histopatologia, indicando que a via digestiva era mais freqüentemente atingida pela infecção.

A inspeção de carcaças ovinas em frigoríficos pode revelar a presença do granuloma da tuberculose, sendo o sistema respiratório o mais acometido, observando-se 82,6% de lesões nos pulmões (FRANCIS, 1958; KUMMENEJE; FODSTAD, 1976; ROBINSON, 1983); entretanto, podem também ser acometidos os diversos linfonodos, em particular os brônquicos, mediastínicos e mesentéricos, além de órgãos como o fígado, baço e os rins (BARTON; ACLAND, 1973; CHAUHAN et al., 1974; CREECH, 1940; PUGH, 2005; ROBINSON, 1955). O granuloma da tuberculose pode apresentar variações de tamanho, sendo firmes e encapsulados, com conteúdo caseoso de cor amarelada ou alaranjada, com cápsula

de espessura aproximada de 5mm (BARTON; ACLAND, 1973; CORDES et al., 1981; DAVIDSON; ALLEY; BEATSON, 1981; HARSHFIELD; RODERICK, 1934; MARSH, 1965; MURPHY, 1935; ROBINSON, 1955; STUBBS; LIVE, 1939; WHITTY; DEMPSEY, 1974).

Para a realização das análises laboratoriais complementares são necessários fragmentos dos tecidos lesados, obtidos por meio de biópsia ou retirados no momento da necropsia. O material deve ser separado e fixado em formalina a 10% para a análise histopatológica (CORDES et al., 1981; KUMMENEJE; FODSTAD, 1976; MARTIN; AITKEN, 2000; SILVA, 2004). Os métodos de coloração utilizados são a Hematoxilina-Eosina e Ziehl-Neelsen (CARMICHAEL, 1938; CORDES et al., 1981; KUMMENEJE; FODSTAD, 1976; WHITTY; DEMPSEY, 1974).

Na análise histológica corada pelo método de Ziehl-Neelsen, observa-se a presença de diversos bacilos ácido-resistentes, com presença de células eptelioides, linfócitos e células gigantes (HARSHFIELD; RODERICK, 1934; PUGH, 2005). Na coloração com Hematoxilina-Eosina observa-se a presença de granulomas com conteúdo caseoso no centro e de áreas mineralizadas cercadas por macrófagos, linfócitos e células gigantes de Langhan's (CORDES et al., 1981).

Na Inglaterra, em 1958, a análise bacteriológica de lesões encontradas em ovinos acometidos pela tuberculose revelou que 64% delas eram causadas pelo *Mycobacterium avium* e que 46% das lesões eram causadas pelo *Mycobacterium bovis* (KUMMENEJE; FODSTAD, 1976).

Em virtude das diversas doenças que acometem o sistema respiratório e que podem ser confundidas com a tuberculose em ovinos, deve-se realizar o diagnóstico diferencial com varias enfermidades, destacando-se: pneumonia supurativa crônica; verminose pulmonar, broncopneumonias, pasteureloses, linfadenite caseosa

(*Corynebacterium pseudotuberculosis*), lesões faríngeas resultantes de traumas, linfossarcoma, raiva, botulismo, *actinobacilose*, faringite necrótica e edema (HIEPE, 1972; PUGH, 2005; RADOSTITIS et al., 2002; SMITH, 2006).

Como já mencionado, das enfermidades que acometem os ovinos, destaca-se a linfadenite caseosa causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que é considerada uma doença infecto-contagiosa crônica que acomete os ovinos e caprinos, sendo considerada de grande importância nos rebanhos (BAIRD; SYNGE; DERCKSEN, 2004; COSTA, 2002;). A doença é caracterizada pela presença de abscessos com pus organizado principalmente localizado nos linfonodos superficiais (LANGENEGGER; LANGENEGGER; SCHERER, 1991; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1989; PATON et al., 2002). Essa doença pode ser facilmente confundida com a tuberculose, devido a semelhança dos sintomas e das lesões em linfonodos (PUGH, 2005), não havendo informações precisas sobre a resposta cruzada de animais com linfadenite caseosa quando submetidos à tuberculinização (LANGENEGGER; LANGENEGGER; SCHERER, 1991; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1989; LANGENEGGER; LANGENEGGER; COSTA, 1987).

2.6 CONTROLE E PROFILAXIA

A tuberculose é uma enfermidade de notificação obrigatória, que pode ocorrer nos rebanhos de ovinos, necessitando, portanto de medidas sanitárias para seu controle neste tipo de criação. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do PNCEBT, recomenda para o controle da tuberculose dos bovinos e bubalinos o diagnóstico utilizando o teste de tuberculina e

o abate de animais reativos a essa prova (LIÉBANA et al., 1998; LILENBAUM, 2000; MAPA, 2004). Nos Programas Estadual (PESCO) e Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO), ainda não existem recomendações especificamente direcionadas a tuberculose em pequenos ruminantes (MAPA, 2004; PGESP, 2006), todavia especialistas no assunto recomendam que os ovinos devam ser submetidos a medidas semelhantes àsqueelas dos bovinos quando suspeitos de tuberculose (ALLEN, 1988; BARTON; ACLAND, 1973; HIEPE, 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; MARSH, 1965; PUGH, 2005).

No Brasil, conforme o Decreto nº 45781 de 27 de abril de 2001, a defesa sanitária prioriza medidas de controle, prevenção e erradicação, recomendando o sacrifício de qualquer animal que apresente doença de notificação compulsória (PGESP, 2006). Este Decreto atua na fiscalização sanitária junto aos frigoríficos, contando com médicos veterinários credenciados na avaliação das carcaças, certificando a qualidade das mesmas.

Barton e Acland (1973) e Allen (1988) acreditavam que uma rigorosa verificação das carcaças condenadas junto aos frigoríficos representaria uma forma de estimar a prevalência da tuberculose nos diferentes países.

Nos EUA e Inglaterra, países em que existe legislação específica para o controle da tuberculose ovina, Jensen e Swift (1982) e Pugh (2005) recomendavam que os ovinocultores submetessem os rebanhos ovinos ao teste tuberculínico periódico, a fim de identificar casos de tuberculose nas criações. Os animais reativos a prova de tuberculina deveriam ser separados e sacrificados, e o material colhido das lesões apresentadas ser enviado para análises histopatológicas e bacteriológicas (JENSEN; SWIFT, 1982; PUGH, 2005).

Nas propriedades criatórias de ovinos devem ser estabelecidos métodos de desinfecção, de controle de transito de animais, de quarentena para animais recém adquiridos, além do controle de reservatórios e notificação de novos casos de animais infectados pelo agente da tuberculose (PUGH, 2005).

Jensen e Swift (1982), Ferreira Neto e Bernardi (1997) e Lilenbaum (2000) destacam que nos EUA, o modelo de controle da tuberculose nos bovinos utiliza como base o alérgoteste tuberculínico e o abate de animais reativos. Nas propriedades de bovinos onde são realizados os testes de tuberculina, aqueles positivos a prova são separados e colocados sob quarentena. Após esse período são submetidos a um novo teste e caso persista a positividade devem ser sacrificados. Essa medida reforça o grande sucesso na erradicação e/ou controle da enfermidade nesse país com o modelo retro-descrito (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997; KANTOR; RITACCO, 1994; LILENBAUM, 2000; SMITH, 2006).

Nos ovinos a medida de controle da tuberculose adotada nos abatedouros era a identificação de carcaças que apresentassem lesões tuberculosas, determinando a condenação das mesmas (HIEPE, 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; MARSH, 1965).

A incidência da enfermidade na espécie ovina ainda hoje é considerada baixa, apesar dos relatos da doença no decorrer dos anos (CORDES et al., 1981; DAVIDSON; ALLEY; BEATSON, 1981; HARSHFIELD; RODERICK; HAWN, 1937; JENSEN; SWIFT, 1982; ROBINSON, 1955).

No caso de coabitação de ovinos com aves, estas também deverão ser submetidas ao controle da tuberculose, devido a susceptibilidade destes pequenos ruminantes à infecção causada pelo *M. avium* (JENSEN; SWIFT, 1982; MARSH, 1965). Dentre as medidas com recém-nascidos, recomendava-se que os cordeiros

deveriam ser alimentados com leite oriundo de cabras leiteiras ou vacas que fossem livres da tuberculose (HIEPE, 1972).

A erradicação da tuberculose nos ovinos deve ser realizada, pois é reconhecido que esses pequenos ruminantes podem se infectar, adoecer e transmitir a enfermidade para outros animais e para o homem, sendo necessário para o estabelecimento de programas de controle que sejam abolidos os conceitos pré-estabelecidos sobre a resistência dos ovinos à infecção causada pelo *Mycobacterium bovis* (JENSEN; SWIFT, 1982). Hiepe (1972) e Jensen e Swift (1982) preconizavam que para o diagnóstico da tuberculose em ovinos era necessário a realização do exame físico e do teste tuberculínico.

Os ovinos reativos a prova tuberculínica devem ser retirados das pastagens, separados dos demais animais e dependendo das normas governamentais os reativos devem ser mantidos sob quarentena para a realização de um novo teste tuberculínico (PUGH, 2005). Assim sendo, as propriedades para serem consideradas livres da tuberculose deveriam submeter seus rebanhos ao teste de tuberculina de 6 em 6 meses para minimizar a disseminação da doença (JENSEN; SWIFT, 1982). Os rebanhos ovinos que apresentarem resultados negativos ao teste de tuberculina em dois exames anuais consecutivos são considerados livres da tuberculose (PUGH, 2005).

2.7 TESTE TUBERCULÍNICO

2.7.1 Tuberculinas

Koch (1932) em seus estudos isolou o bacilo da tuberculose, considerando-o responsável pela tuberculose humana. Dando continuidade as suas pesquisas isolou o agente também de animais. Em 1890, a partir do agente isolado, Koch produziu a tuberculina apostando inicialmente em seu poder curativo. Posteriormente, reconheceu a possibilidade de ser aplicada em testes para o diagnóstico da tuberculose nos seres humanos demonstrando a resposta de hipersensibilidade tardia, surgindo assim, o teste tuberculínico (MONAGHAN et al., 1994; PRITCHARD, 1988). A seguir a tuberculina passou também a ser utilizada para diagnosticar a tuberculose em animais ruminantes (MAPA, 2004; ROXO, 1996; ROXO et al., 1998; SILVA, 2004).

Tuberculina é o nome dado aos extratos de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. avium* utilizados no teste tuberculínico (FERRI; CALICH; VAZ, 1977; TIZARD, 2000). No decorrer do tempo as preparações das tuberculinas sofreram alterações na maneira de serem produzidas. Inicialmente, era a tuberculina “*Old tuberculin*” (O. T.), apresentada nos moldes originais desenvolvidos por Koch, a qual apresentava variações entre as partidas produzidas. Na tentativa de melhorar a qualidade da tuberculina e corrigir esta limitação desenvolveu-se a tuberculina “*Heat concentrated sintetic medium*” (HCSM) ou tuberculina preparada em meio sintético e concentrada pelo calor. Posteriormente, as melhorias na técnica de produção e purificação, permitiram a elaboração da tuberculina mais padronizada chamada

“*purified protein derivate*” (PPD) utilizada até hoje (FERRI; CALICH; VAZ, 1977; MONAGHAN et al., 1994; WHO, 2006; SAHOO, 1951). O Derivado protéico purificado (*purified protein derivate* - PPD) é considerado como puro, porém na verdade é constituído por uma mistura complexa de proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucleicos, incluindo uma variedade de antígenos. O PPD bovino tem origem do *Mycobacterium bovis* (AN5) e o aviário oriundo do *Mycobacterium avium* (D4) (MONANGHAN et al., 1994; SAHOO, 1951).

2.7.2 Reação Tuberculínica

O teste tuberculínico vem sendo empregado para o diagnóstico da tuberculose nos bovinos há várias décadas, desde os primórdios de sua descoberta (MONANGHAN et al., 1994). A prova da tuberculina avalia a intensidade da resposta de hipersensibilidade tardia (tipo IV), que desencadeia uma resposta inflamatória específica mediada por célula (linfócitos T) no local da injeção intradérmica de tuberculina, em animal sensibilizado contra antígenos protéicos originados de micobactérias (FERRI; CALICH; VAZ, 1977; MONAGHAN et al., 1994; THOEN, 1988; TIZARD, 2000).

No local da injeção intradérmica, os animais infectados ou sensibilizados apresentam uma reação caracterizada pela formação de pápulas rodeada por eritema e edema de consistência firme, diferente do observado em animais sadios. O processo inflamatório local tem início no período de 12 a 24 horas, atingindo intensidade máxima de 24 a 72 horas, podendo ocorrer destruição tecidual e necrose nas reações severas. A reação tuberculínica é uma resposta inflamatória

mediada por células. Ao ocorrer a infecção pelo *Mycobacterium*, essas bactérias são fagocitadas e apresentadas aos linfócitos-T, gerando células de memória que permanecem ativas por vários anos (FERRI; CALICH; VAZ, 1977; MONAGHAN et al., 1994; TIZARD, 2000).

Os estudos histológicos da reação tuberculínica, nos bovinos tem demonstrado que no início da reação as células predominantes são neutrofilos e linfócitos T, porém com a progressão da reação, entre 48 e 72 horas, encontra-se predominantemente células mononucleares (DOHERTY et al., 1996; FELDMAN; FITCH, 1937). Roxo (1996), em seu estudo com bubalinos demonstrou que após 72 horas da injeção intradérmica da tuberculina, observava-se um intenso infiltrado celular predominantemente mononuclear. Silva (2004), trabalhando com caprinos também observou infiltrado celular com as mesmas características.

2.7.3 Testes de Tuberculina Utilizados

Antigamente eram utilizadas outras provas para o diagnóstico da tuberculose, incluídas entre elas os testes térmicos intravenoso e subcutâneo, indicando resposta positiva quando os animais submetidos à aplicação apresentavam elevação de temperatura acima de 40°C no intervalo de 4 a 8 horas pós-injeção (SMITH, 2006). Outra prova utilizada para bovinos era o teste de Stormont, que usava o PPD mamífero de forma diferenciada. O teste era realizado por meio da aplicação intradérmica repetida duas vezes no mesmo local, com intervalo de sete dias. A resposta era avaliada 24 horas após a segunda injeção considerando o animal

positivo quando a espessura da pele apresentasse um aumento superior a 5mm (RADOSTITIS et al., 2002; SMITH, 2006).

Nos EUA, o teste tuberculínico é realizado somente por médicos veterinários credenciados e autorizados. A prova é realizada na região da prega ano-caudal, com leitura da reação às 72 horas após a injeção. Outra prova realizada é o teste cervical comparativo na realização do qual injeta-se o PPD aviário e PPD bovino simultaneamente, em dois pontos da pele da região cervical. A leitura da reação é realizada após 72 horas do momento da injeção, verificando-se a diferença da medida de espessura da pele obtida no momento imediatamente antes da injeção do PPD e aquela obtida na leitura após 72 horas (SMITH, 2006; SUTHER; FRANTI; PAGE, 1974).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), recomenda para bovinos e bubalinos, a utilização de dois testes tuberculínicos. O teste intradérmico simples que é realizado com o uso do PPD bovino e o teste cervical comparativo (duplo comparado). O teste intradérmico simples pode ser efetuado em duas regiões corpóreas distintas, ou seja, na região cervical (tábua do pescoço) ou na prega ano-caudal. No local escolhido injeta-se 0,1 mL de PPD bovino, via intradérmica, respectivamente no terço médio do pescoço ou seis centímetros da base da cauda. No caso do teste realizado na região cervical, a leitura é realizada através da diferença da espessura da pele medida no momento antes da injeção e às 72 horas (\pm 6 horas) após. O teste cervical comparativo é recomendado pelo PNCEBT, a semelhança do teste utilizado nos EUA, preconizando a injeção do PPD aviário cranialmente e a do PPD bovino caudalmente, em pontos distintos entre si de 15 cm, simultaneamente, na região

cervical (GONZÁLEZ LLAMAZARE et al., 1999; LESSLIE; HEBERTY, 1975; MAPA, 2004; MONAGHAN et al., 1994; SMITH, 2006).

O teste intradérmico simples, na região cervical ou na ano-caudal quando analisados para bovinos apresentam, respectivamente, uma sensibilidade de 83,3% e uma especificidade de 79%, e sensibilidade de 50% e especificidade de 94% (RAGASSA; AMENI, 2001).

O teste duplo comparado é utilizado para diferenciar respostas inespecíficas, que podem ocorrer em animais infectados por *M. paratuberculosis*, *M. avium* e *Nocardia ssp* (LILENBAUM, 2000; MONAGHAN et al., 1994). As tuberculinas, aviária e bovina, são injetadas e as reações lidas conforme o teste intradérmico simples na região cervical (MAPA, 2004).

O teste tuberculínico pode determinar reação com sensibilidade e aumento local que persistem por aproximadamente 12 dias, ocorrendo após esse período uma hipossensibilização generalizada. Desta maneira as repetições dos testes poderiam ser realizadas dentro de uma janela de 12 dias (SMITH, 2006).

O teste tuberculínico também é utilizado na espécie ovina para o diagnóstico da tuberculose (CORDES et al., 1981; HIEPE, 1972), seguindo-se recomendações similares àquelas dos bovinos para realização e interpretação do resultado do teste, entretanto, alguns autores destacam a possibilidade de sua realização na pele da face interna do membro posterior, acreditando que se obtenha uma melhor resposta para a prova (CORDES et al., 1981; DAVIDSON; ALLEY; BEATSON, 1981; JENSEN; SWIFT, 1982). Cordes et al. (1981), realizando o teste de tuberculina no membro posterior de ovinos encontraram uma sensibilidade de 81,6% e especificidade de 99,6%.

Em alguns países, nas propriedades dedicadas à ovinocultura o teste de tuberculina só era realizado para determinar o valor de venda dos ovinos. A prova era efetuada no membro posterior e a medição feita com o auxílio de um compasso especial, às 72 e às 96 horas. Cordes et al. (1981) consideravam que os ovinos que apresentassem um aumento de pele superior a 2mm eram positivos à prova. Malone et al. (2003) utilizando padrões de bovinos em espécimes ovinos interpretavam um animal como positivo ao teste de tuberculina quando o aumento da espessura da pele fosse superior a 5mm. Recomendava-se em concomitância, quando os animais eram positivos ao teste tuberculínico, que fossem submetidos à necropsia (CORDES et al., 1981; MALONE et al., 2003).

Na Nova Zelândia os diagnósticos dos casos de tuberculose em ovinos ocorriam de forma ocasional, apresentando-se geralmente com lesões localizadas e evolução crônica da doença. Nesta época, os ovinos foram submetidos a testes com tuberculina sintética produzida com o *M. tuberculosis*; os testes foram efetuados na pele da parte interna do membro posterior injetando-se 0,1ml da suspensão tuberculínica, sendo a leitura realizada 72 horas após injeção, com a observação do aumento de volume no local da aplicação. Devido à falta de padrões para análise da resposta tuberculínica, considerava-se qualquer tipo de inflamação como sinal de animal reativo ao agente da enfermidade (DAVIDSON; ALLEY; BEATSON, 1981).

Hiepe (1972), observou que a região ano-caudal, em ovinos, apresentava-se mais sensível e reativa à tuberculina do que a região cervical, pois as reações tuberculínicas foram de uma a duas vezes maior que aquelas da região cervical.

Nos testes tuberculínicos podem ocorrer reações falso-negativas decorrentes de casos avançados de tuberculose, infecção recente, animais pré e pós parto, animais idosos ou desnutridos, além de variação da dose de tuberculina com o uso

de seringas multidosificadoras, ou de simultânea utilização de drogas imunossupressoras. Os animais recém-infectados podem apresentar uma resposta entre 30 e 50 dias após a infecção. Contudo, os animais que se apresentam em estágios avançados da doença, podem manifestar anergia que é a ausência de reação de hipersensibilidade tardia ao teste cutâneo (MONAGHAN et al., 1994; RADOSTITIS et al., 2002; SMITH, 2006; SUTHER; FRANTI; PAGE, 1974).

A reação falso-positivo pode ocorrer com infecções causadas pelo *M. avium*, Doença de Johne's (*M. paratuberculosis*), *M. tuberculosis* e outros agentes como o *Nocardia spp* (BUDDLE et al., 2003; DUFFIELD; NORTON; STREETEN, 1985; SMITH, 2006; SUTHER; FRANTI; PAGE, 1974).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram selecionados 30 ovinos adultos que se apresentavam hígidos à avaliação clínica (PUGH, 2005; SMITH; SHERMAN, 1994) e com resposta negativa ao teste tuberculínico cervical comparativo (conforme o critério utilizado para os bovinos) (MAPA, 2004). Destes ovinos, oito eram oriundos do setor experimental da Clínica de bovinos e pequenos ruminantes do Departamento de Clínica Médica, Campus da capital /SP, e vinte e dois originários do Departamento de Reprodução Animal, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.2 EXAME FÍSICO

Para a seleção e inclusão dos ovinos nos grupos experimentais, durante a sensibilização e o período de avaliação da prova tuberculínica (às 0h, 12hs, 24hs, 48hs, 72hs e 96hs), todos os animais foram submetidos ao exame físico (SMITH; SHERMAN, 1994; PUGH, 2005), através da avaliação do estado geral, das mucosas aparentes e da monitoração das funções vitais (frequências dos movimentos respiratórios, dos batimentos cardíacos e dos movimentos ruminais, e temperatura

corporal). O objetivo destas avaliações foi o de garantir a higidez dos ovinos utilizados e observar indícios de possíveis reações adversas decorrentes da sensibilização ou da tuberculinização.

3.3 TESTE TUBERCULÍNICO SEGUNDO O PLANO NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E TUBERCULOSE (PNCEBT)

Neste experimento para a avaliação e triagem inicial dos ovinos foram utilizados os valores padrões do teste tuberculínico, teste cervical comparativo (TCC), estabelecidos no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Estes valores estão sumarizados no quadro 1.

Teste cervical comparativo (reação)	Diferença $\Delta B - \Delta A$ (mm)	Resultado em relação a tuberculose
$\Delta B < 2,00$	-	NEGATIVO
$\Delta B < \Delta A$	< 0	NEGATIVO
$\Delta B \geq \Delta A$	0,00 A 1,90	NEGATIVO
$\Delta B > \Delta A$	2,00 A 3,90	INCONCLUSIVO
$\Delta B > \Delta A$	$\geq 4,00$	POSITIVO

Quadro 1 - Valores de referência do teste cervical comparativo utilizados pelo PNCEBT, para o controle da tuberculose em bovinos e bubalinos (MAPA, 2004)

3.4 SENSIBILIZANTES

Os inóculos sensibilizantes padrões (partida 001/02) foram preparados pelo Laboratório de Referência Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - LARA-MAPA, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, consistindo em uma suspensão de *M. avium* estirpe D4 e uma suspensão de *M. bovis* estirpe AN5, preparadas segundo as recomendações do Centro Panamericano de Zoonoses (CPZ, 1980).

3.5 SENSIBILIZAÇÃO

Após 45 dias do teste tuberculínico negativo utilizado para a triagem inicial, os animais foram sensibilizados com a aplicação via intramuscular dos inóculos padrões. A distribuição destes 30 ovinos foi feita em: um grupo A, que recebeu uma injeção intramuscular, contendo 0,5 mL de uma suspensão oleosa de *M. avium* estirpe D4; um grupo B, que recebeu 0,5 mL de uma suspensão oleosa de *M. bovis* estirpe AN5 e um grupo C (controle), que recebeu 0,5 mL de solução fisiológica, sendo cada grupo constituído por 10 animais cujas características estão descritas no quadro 2.

NÚMERO	GRUPO	SEXO	RAÇA	IDADE
01	A	F	LANADA	ADULTO
06	A	F	MESTIÇA	ADULTO
09	A	F	MESTIÇA	ADULTO
10	A	F	SANTA INÊS	ADULTO
12	A	F	SANTA INÊS	JOVEM
19	A	M	SANTA INES	ADULTO
20	A	M	SANTA INÊS	ADULTO
21	A	M	MESTIÇA	ADULTO
22	A	M	SANTA INÊS	ADULTO
32	A	F	SANTA INÊS	ADULTO
02	B	F	LANADA	ADULTO
04	B	F	SANTA INÊS	ADULTO
07	B	F	SANTA INÊS	ADULTO
11	B	F	SANTA INÊS	ADULTO
13	B	M	SANTA INÊS	JOVEM
14	B	M	LANADA	ADULTO
16	B	M	LANADA	ADULTO
24	B	M	SANTA INÊS	ADULTO
29	B	F	SANTA INÊS	ADULTO
31	B	F	SANTA INÊS	ADULTO
03	C	F	LANADA	ADULTO
05	C	F	SANTA INÊS	ADULTO
08	C	F	MESTIÇA	ADULTO
15	C	M	SANTA INÊS	ADULTO
17	C	M	MESTIÇA	ADULTO
18	C	M	LANADA	ADULTO
23	C	M	SANTA INÊS	ADULTO
25	C	M	SANTA INÊS	ADULTO
26	C	F	SANTA INÊS	ADULTO
27	C	F	SANTA INÊS	ADULTO

Quadro 2 - Ovinos submetidos ao teste cervical comparativo para o diagnóstico da tuberculose, conforme o número de identificação do animal, o grupo experimental a que pertenciam (A – sensibilizado por *M. avium*; B – sensibilizado por *M. bovis* e C – controle, não sensibilizado), o sexo (M – masculino e F – feminino), a raça e a idade - São Paulo - 2006

3.6 TUBERCULINIZAÇÃO

Passados 35 dias da sensibilização, realizou-se o teste tuberculínico cervical comparativo, injetando-se 0,1 mL de PPD aviário (tuberculina aviária) e 0,1 mL de PPD bovino (tuberculina bovina), intradermicamente, após a tricotomia, na região

Cyrillo, F.C.

cervical, a uma distância de 7 cm entre os locais de aplicação, sendo o PPD aviário injetado cranialmente e o PPD bovino caudalmente. A medida da espessura da pele foi realizada com uso de cutímetro¹, no momento imediatamente anterior ao da aplicação da tuberculina 0 (zero) hora, às 12, 24, 48, 72, e 96 horas após a injeção da tuberculina.

Foram utilizados PPD aviário contendo 0,5 mg / mL e PPD bovino contendo 1 mg/mL de tubérculo-proteínas, respectivamente, produzidos pelo Laboratório de Referência Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em Minas Gerais- LARA-MAPA. Estes produtos pertenciam a partida 001/02, estando dentro do prazo de validade estipulado pelo fabricante.

3.7 AMOSTRAS DE PELE

Para a avaliação histológica do local em que se provocou a reação tuberculínica, foram colhidas amostras de pele, com uso de “punch²” de 3,0 mm de diâmetro, em cinco animais do grupo A, cinco do B e quatro do grupo C, às 96 horas após injeção do PPD aviário e bovino. No entanto, para o controle, no momento antes da aplicação, foram retiradas amostras de pele somente dos animais do Grupo C, com o intuito de demonstrar-se o aspecto histológico normal da pele.

¹ Produzido pela HAUPTNER.

² BD- Becton, Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda.

3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para exame histopatológico, os fragmentos de pele foram colhidos e logo em seguida fixados em formol a 10 % tamponado, incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo comum com 5 micrômetro de espessura. A coloração obedeceu a metodologia da Hematoxilina-Eosina. A análise dos cortes histológicos foi realizada em Foto-microscópio de luz comum, marca Olympus e fotografados com câmera digital.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram testados, inicialmente, quanto à sua distribuição normal utilizando-se, para tanto, o teste de Kolmogorov – Smirnov. As variáveis estudadas foram descritas por meio das respectivas medidas de tendência central: médias e desvios – padrão (SAMPAIO, 1998).

Objetivando-se avaliar o efeito dos tempos de leitura (intragrupo), assim como dos tratamentos propostos (intergrupo), os dados foram submetidos inicialmente a análise de variância pelo teste F (ANOVA) e, quando significativa, realizou-se contraste entre médias pelo teste de Duncan, considerando-se o nível de significância de 5% (SAMPAIO, 1998). Os dados foram tabulados e processados em programa estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS, 2000).

Estabeleceram-se, também, os intervalos de confiança (95%) superior e inferior para o tempo de 72 horas da leitura, em cada tratamento (SAMPAIO, 1998), para avaliar as respostas homólogas, heterólogas e reações mecânicas. Foi utilizado o programa estatístico Graphpad Instat (GRAPHPAD SOFTWARE, 1998) para a obtenção destes intervalos.

4 RESULTADOS

Durante o experimento, os ovinos utilizados não apresentaram alterações notáveis no estado geral ou nas mucosas aparentes. As funções vitais permaneceram dentro dos limites fisiológicos de variação estabelecidos para a espécie ovina e descritos por Smith e Sherman (1994) e Pugh (2005), em todo o período do estudo.

4.1 TESTE IMUNO-ALÉRGICO CUTÂNEO

Os resultados do teste tuberculínico cervical comparativo em ovinos sensibilizados, experimentalmente, com micobactérias mortas do tipo aviário (*M. avium*) (grupo A) ou bovino (*M. bovis*) (grupo B) e controle ou não sensibilizados (grupo C), injetados somente com solução fisiológica (NaCl 0,9%), estão demonstrados nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. Conforme o grupo considerado, as reações foram classificadas como: homólogas (PPD que induz a reação é semelhante ao tipo de micobactéria sensibilizante); heterólogas (PPD que induz a reação difere do tipo de micobactéria sensibilizante) e reação mecânica, observada no grupo controle não sensibilizado (SILVA et al., 2006).

Tabela 1 - Espessura da pele (mm), na região cervical, de ovinos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão de *M. avium*, conforme o grupo, o número de identificação, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicado e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária - São Paulo - 2006

		Teste Cervical Comparativo														
Grupo	Nº do Animal	0 hora (a. i.)		12 horas (p. i.)		24 horas (p. i.)		48 horas (p. i.)		72 horas (p. i.)		96 horas (p. i.)				Resultado
		PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD Bf	PPD Af	
A	12	4,10	3,70	5,40	4,90	6,00	6,40	5,20	7,00	5,20	6,60	5,00	5,80	1,10	2,90	1,80
A	19	7,00	5,60	6,80	5,80	7,90	7,70	7,90	7,50	7,90	7,50	7,90	7,50	0,90	1,90	1,00
A	20	5,30	4,50	5,60	5,10	6,20	6,60	5,30	6,80	5,00	6,20	4,90	5,50	-0,30	1,70	2,00
A	21	5,20	5,00	5,80	5,70	6,80	7,60	6,80	7,50	6,90	7,40	6,70	7,10	1,70	2,40	0,70
A	22	6,20	4,90	6,90	6,50	7,20	8,10	6,70	6,90	6,80	6,90	6,50	6,90	0,60	2,00	1,40
A	1	4,10	3,60	5,30	6,20	6,40	7,40	6,60	11,90	7,70	9,00	7,00	9,30	3,60	5,40	1,80
A	6	5,30	4,40	6,70	6,20	8,20	9,90	7,60	9,90	7,30	8,50	7,00	7,20	2,00	4,10	2,10
A	9	3,70	3,70	5,40	6,10	5,90	8,40	5,80	9,30	5,60	8,60	5,30	7,00	1,90	4,90	3,00
A	10	4,20	4,20	5,90	5,90	6,50	7,70	6,70	9,80	6,00	7,10	5,60	6,60	1,80	2,90	1,10
A	32	3,90	4,80	5,00	6,00	5,50	7,30	4,80	7,80	5,20	7,10	4,60	5,50	1,30	2,30	1,00
	Média	4,90	4,44	5,88	5,84	6,66	7,71	6,34	8,44	6,36	7,49	6,05	6,84	1,46	3,05	1,59
	DP	1,09	0,66	0,68	0,50	0,87	0,98	1,03	1,70	1,09	0,92	1,11	1,13	1,03	1,30	0,69
	IC i													0,72	2,12	1,10
	IC s													2,20	3,98	2,08

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

DP= desvio padrão.

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

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

PPD (Purified Protein Derivative - Derivado Protéico purificado) = tuberculina.

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina.

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

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

Tabela 2 – Espessura da pele (mm), na região cervical, de ovinos sensibilizados experimentalmente com uma suspensão de *M. bovis*, conforme o grupo, o número de identificação, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicado e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária - São Paulo - 2006

		Teste Cervical Comparativo														
Grupo	Nº do Animal	0 hora (a. i.)		12 horas (p. i.)		24 horas (p. i.)		48 horas (p. i.)		72 horas (p. i.)		96 horas (p. i.)		PPD Bf	PPD Af	Resultado
		PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A			
B	4	5,40	4,20	5,70	4,10	7,10	5,10	8,00	5,80	8,10	5,20	7,40	5,20	2,70	1,00	1,70
B	13	4,70	3,70	6,40	4,80	9,00	6,00	10,04	5,60	12,90	5,10	13,20	4,50	8,20	1,40	6,80
B	14	5,60	5,30	7,40	6,00	8,70	7,70	8,60	7,10	8,10	7,40	7,80	6,60	2,50	2,10	0,40
B	16	6,40	5,30	6,90	5,50	8,90	6,10	9,10	6,00	9,00	5,80	8,80	5,80	2,60	0,50	2,10
B	24	4,40	4,30	5,60	4,90	6,60	5,90	7,90	6,70	7,50	6,70	7,20	5,70	3,10	2,40	0,70
B	2	4,60	4,50	6,40	5,70	7,20	6,40	7,70	7,60	6,90	7,10	6,70	6,70	2,30	2,60	-0,30
B	7	5,60	5,00	7,40	6,70	10,90	7,90	15,90	9,90	16,30	10,60	16,40	10,10	10,70	5,60	5,10
B	11	4,90	4,80	5,90	5,50	8,90	7,40	10,90	8,40	8,80	7,50	9,30	6,00	3,90	2,70	1,20
B	29	3,50	2,60	5,50	4,20	8,70	4,90	9,00	4,40	6,30	3,30	5,60	3,30	2,80	0,70	2,10
B	31	3,40	3,60	5,40	5,00	7,50	6,50	12,70	6,80	12,50	6,70	10,20	5,40	9,10	3,10	6,00
	Média	4,85	4,33	6,26	5,24	8,35	6,39	9,98	6,83	9,64	6,54	9,26	5,93	4,79	2,21	2,58
	DP	0,95	0,85	0,76	0,80	1,27	1,02	2,59	1,55	3,20	1,93	3,29	1,77	3,22	1,49	2,48
	IC i													2,49	1,14	0,80
	IC s													7,09	3,28	4,36

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

DP= Desvio padrão.

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

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

PPD (Purified Protein Derivative - Derivado Protéico purificado) = tuberculina.

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina.

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

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

Tabela 3 – Espessura da pele (mm), na região cervical, de ovinos não sensibilizados que receberam injeção de solução fisiológica (0,9 % NaCl), conforme o grupo, o número de identificação, o momento da leitura antes e após a injeção de PPD, o tipo de tuberculina aplicado e a diferença entre a reação à tuberculina bovina e aviária - São Paulo - 2006

		Teste Cervical Comparativo														
Grupo	Nº do Animal	0 hora (a. i.)		12 horas (p. i.)		24 horas (p. i.)		48 horas (p. i.)		72 horas (p. i.)		96 horas (p. i.)		PPD Bf	PPD Af	Resultado
		PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A	PPD B	PPD A			
C	5	5,10	4,70	5,00	4,80	5,00	5,00	5,00	5,20	5,10	5,20	5,00	5,00	0,00	0,50	0,50
C	15	5,40	3,60	5,30	4,50	5,50	5,20	6,00	5,30	6,40	5,40	6,00	5,10	1,00	1,80	0,80
C	17	5,80	5,40	5,90	6,00	6,70	7,80	6,70	7,60	6,90	8,10	6,40	7,90	1,10	2,70	1,60
C	18	7,60	6,30	8,10	6,70	8,30	7,50	7,40	6,90	7,40	7,30	7,20	7,20	-0,20	1,00	1,20
C	23	7,50	5,60	6,90	5,90	7,00	6,60	6,90	6,70	7,50	6,50	7,30	6,40	0,00	0,90	0,90
C	3	4,20	4,80	5,40	5,50	6,50	7,80	5,20	6,90	5,00	7,00	5,00	6,20	0,80	2,20	1,40
C	8	4,60	4,50	4,70	4,80	6,40	6,30	5,70	6,00	5,90	6,50	5,30	5,60	1,30	2,00	0,70
C	25	2,50	2,00	3,20	3,60	5,10	4,90	3,50	4,60	3,70	5,00	3,80	3,80	1,20	3,00	1,80
C	26	2,50	2,40	2,90	3,00	3,50	3,50	3,50	3,90	3,90	3,90	3,90	4,30	1,40	1,50	0,10
C	27	3,40	3,00	3,40	4,60	3,50	4,30	3,40	4,30	3,60	4,30	3,50	3,60	0,20	1,30	1,10
	Média	4,86	4,23	5,08	4,94	5,75	5,89	5,33	5,74	5,54	5,92	5,34	5,51	0,68	1,69	1,01
	DP	1,81	1,43	1,65	1,12	1,53	1,53	1,48	1,26	1,50	1,37	1,37	1,43	0,61	0,80	0,52
	IC i													0,24	1,12	0,64
	IC s													1,12	2,27	1,38

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

DP= Desvio padrão.

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

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

PPD (Purified Protein Derivative - Derivado Protéico purificado) = tuberculina.

PPD A = tuberculina aviária.

PPD B = tuberculina bovina.

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

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

Nos grupos de ovinos sensibilizados com as cepas padrões *M. avium* e *M. bovis*, as reações homólogas apresentaram magnitudes que foram estatisticamente significantes em relação àquelas reações mecânicas do grupo controle (Tabela 4). Os valores médios dos aumentos gerais da espessura de pele de ovinos, induzidos pela tuberculinização, estão apresentados na tabela 4 e são representados pelo gráfico 1.

Tabela 4 - Valores médios gerais dos aumentos de espessura da pele (mm) dos ovinos, obtidos das medidas de todos os momentos das leituras, induzidos pelos PPD B (bovino) e PPD A (aviário), aplicados na região cervical, conforme os grupos experimentais - São Paulo - 2006

Grupo		PPD	
		Bovino	Aviário
A	média	6,03 b	6,79 a
	IC i	5,38	5,27
	IC s	6,68	8,31
B	média	8,06 a	5,87 b
	IC i	5,89	4,89
	IC s	10,22	6,86
C	média	5,32 b	5,37 b
	IC i	4,98	4,67
	IC s	5,65	6,07

Nota: Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).
 Grupo A – sensibilizado por *M. Avium*; Grupo B – sensibilizado por *M. Bovis* e Grupo C – não sensibilizado/ controle.
 ICi = intervalo de confiança inferior (95%).
 ICs = intervalo de confiança superior (95%).

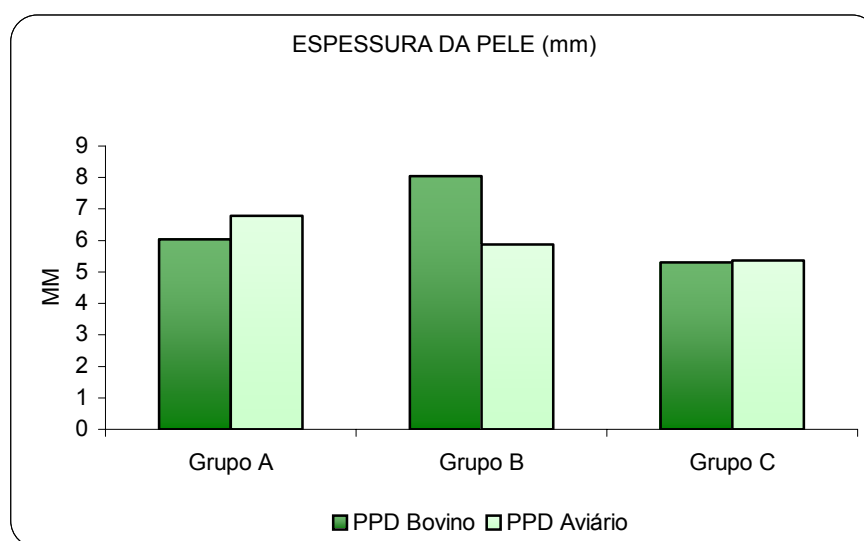


Gráfico 1 - Valores médios gerais dos aumentos de espessura da pele (mm), obtidos no teste cervical comparativo, induzidos pelos PPD B (bovino) e PPD A (aviário), conforme os grupos experimentais de ovinos (Grupo A-sensibilizado com *M. avium*; grupo B-sensibilizado com *M. bovis* e Grupo C não sensibilizado / controle) - São Paulo - 2006

O aumento de espessura da pele em milímetros, na região cervical, atingiu a magnitude máxima às 48 horas após a aplicação das tuberculinas aviária (Gráfico 2) e bovina (Gráfico 3), não havendo diferença estatística, em relação, aos valores observados às 72 horas para as duas tuberculinas (Tabelas 5 e 6). Assim sendo, para uma padronização do tempo de leitura considerou-se as normas do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose que preconiza realizá-la às 72 horas \pm 6 horas após a injeção de tuberculina, adotou-se como referência esse momento de leitura para a apresentação dos resultados deste trabalho.

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão (mm) dos aumentos de espessura da pele de ovinos, induzidos pelo PPD aviário, aplicado na região cervical, segundo os grupos experimentais e os momentos da leitura dos resultados antes (a.i.) e após injeção (p.i.) de PPD - São Paulo – 2006

Grupo	Momento de Leitura					
	0 hora (a.i.)	12 horas (p.i.)	24 horas (p.i.)	48 horas (p.i.)	72 horas (p.i.)	96 horas (p.i.)
A	4,44±0,66 aA	5,84±0,50 aAB	7,71±0,98 aBC	8,44±1,70 aC	7,49±0,92 aBC	6,84±1,13 aBC
B	4,33±0,85 aA	5,24±0,80 aAB	6,39±1,02 aB	6,83±1,55 abB	6,54±1,92 aB	5,93±1,77 aA
C	4,23±1,42 Aa	4,94±1,12 aA	5,89±1,53 aA	5,74±1,26 bA	5,92±1,37 aA	5,51±1,43 aA

Nota: Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada momento de leitura ($p < 0,05$).
Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).
Grupo A – sensibilizado por *M. avium*; Grupo B – sensibilizado por *M. bovis* e Grupo C – não sensibilizado/ controle.

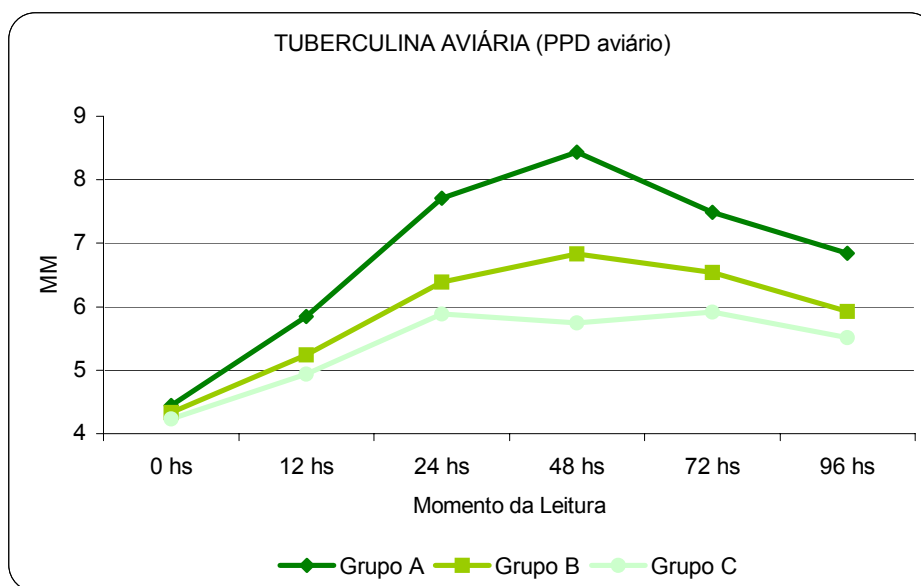


Gráfico 2 - Valores médios da espessura da pele de ovinos, medidos em milímetros, no local da aplicação do PPD aviário, segundo os grupos experimentais (Grupo A - sensibilizado com *M. avium*; grupo B - sensibilizado com *M. bovis* e Grupo C não sensibilizado / controle) e os momentos da leitura do resultado do teste cervical comparativo - São Paulo – 2006

Tabela 6 - Valores médios e desvios padrão dos aumentos de espessura da pele de ovinos, induzidos pelo PPD bovino, aplicado na região cervical, conforme os grupos experimentais e o momento da leitura dos resultados antes (a.i.) e após injeção (p.i.) de PPD – São Paulo - 2006

Grupo	Momento de Leitura					
	0 hora (a.i.)	12 horas (p.i.)	24 horas (p.i.)	48 horas (p.i.)	72 horas (p.i.)	96 horas (p.i.)
A	4,90±1,09 aA	5,88±0,68 aA	6,66±0,87 aA	6,34±1,03 aA	6,36±1,09 aA	6,05±1,11 aA
B	4,85±0,94 aA	6,26±0,76 aAB	8,35±1,27 aBC	9,98±2,59 bC	9,64±3,20 bC	9,26±3,29 bC
C	4,86±1,81 aA	5,08±1,65 aA	5,75±1,53 aA	5,33±1,48 aA	5,54±1,50 aA	5,34±1,37 aA

Nota: Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada momento de leitura ($p < 0,05$).
Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).
Grupo A – sensibilizado por *M. avium*; Grupo B – sensibilizado por *M. bovis* e Grupo C – não sensibilizado/ controle.

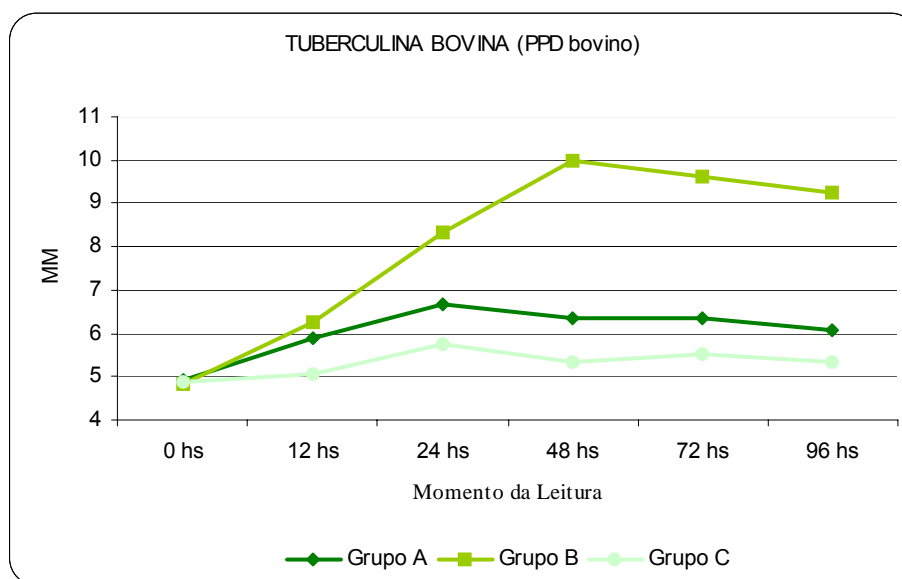


Gráfico 3 - Valores médios da espessura da pele de ovinos, medidos em milímetros, no local de aplicação do PPD bovino, segundo os grupos experimentais (Grupo A-sensibilizado com *M. avium*; grupo B-sensibilizado com *M. bovis* e Grupo C não sensibilizado / controle) e o momento da leitura dos resultados do teste cervical comparativo – São Paulo – 2006

Em relação aos resultados obtidos ao teste cervical comparativo, não houve diferença estatística na comparação da intensidade de resposta às tuberculinas

entre os grupos A e C, porém os ovinos do grupo B apresentaram reações com diferenças significativas e superiores àquelas obtidas nos animais dos grupos A e C. No entanto, nos ovinos do grupo C (controle) as reações foram de menor magnitude que aquelas observadas no grupo A (Tabela 7). Os valores médios das diferenças entre reações às tuberculinas obtidas no teste cervical comparativo nos grupos experimentais estão representados no gráfico 4.

Tabela 7 – Resultados das diferenças (mm) entre a intensidade de reação aos PPD bovino e aviário, em ovinos submetidos ao teste cervical comparativo, segundo os grupos experimentais e o momento da leitura dos resultados. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão – São Paulo – 2006

Grupo	Momento de Leitura					
	0 hora (a.i.)	12 horas (p.i.)	24 horas (p.i.)	48 horas (p.i.)	72 horas (p.i.)	96 horas (p.i.)
A	0,46 \pm 0,69 aA	0,04 \pm 0,68 aA	1,05 \pm 0,79 aAB	2,1 \pm 1,71 aB	1,13 \pm 0,94 aA	0,79 \pm 0,76 aA
B	0,52 \pm 0,50 aA	1,02 \pm 0,48 aA	1,96 \pm 1,12 bAB	3,15 \pm 2,02 bB	3,10 \pm 2,61 bB	3,33 \pm 2,61 bB
C	0,63 \pm 0,79 aA	0,14 \pm 0,75 aA	0,14 \pm 0,69 aA	0,41 \pm 0,75 aA	0,38 \pm 0,97 aA	0,17 \pm 0,77 aA

Nota: Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura ($p < 0,05$).
Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).
a. i. = diferença de medida da espessura da pele em mm, entre o local de aplicação do PPD bovino e o aviário, antes da injeção da tuberculina.
p. i. = diferença de medida da espessura da pele em mm, entre o local de aplicação do PPD bovino e o aviário, após a injeção da tuberculina.
Grupo A – sensibilizado (*M. avium*); Grupo B – sensibilizado (*M. bovis*) e Grupo C – não sensibilizado/controle.

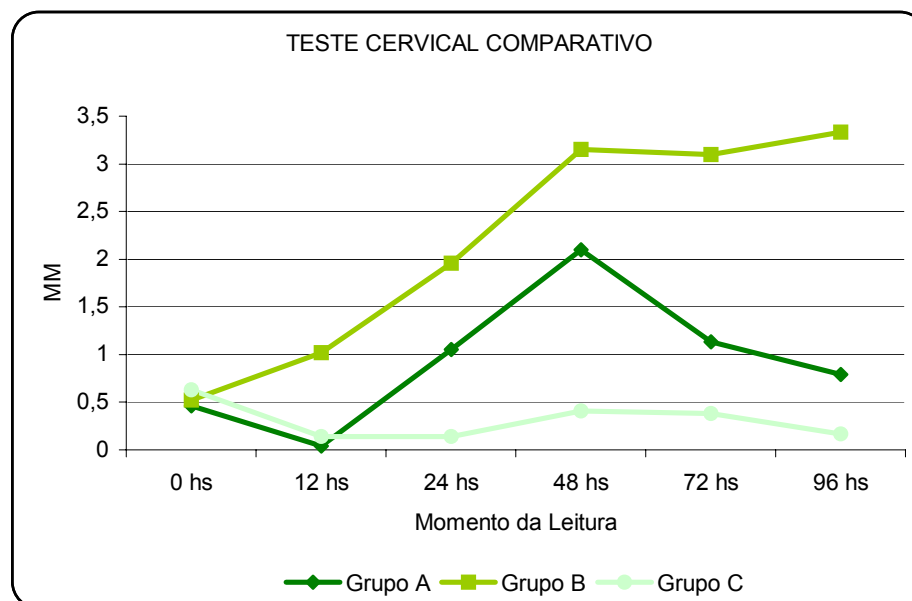


Gráfico 4 - Valores médios da diferença entre a espessura da pele de ovinos, medidos em milímetros, nos locais de reação ao PPD B (bovino) e ao PPD A (aviário), segundo os grupos experimentais (Grupo A – sensibilizado por *M. avium*; Grupo B – sensibilizado por *M. bovis* e Grupo C – não sensibilizado/ controle) e o momento da leitura dos resultados do teste cervical comparativo – São Paulo - 2006

As reações homólogas, para as duas tuberculinas às 72 horas (ao PPD aviário e ao PPD bovino), apresentaram os limites dos intervalos de confiança, respectivamente, variando entre 2,12 e 3,98mm, e 2,49 e 7,09mm (Tabelas 1 e 2). As reações heterólogas ao PPD aviário e ao PPD bovino situaram-se, respectivamente, entre 0,72 e 2,20mm, e 1,14 e 3,28 mm (Tabelas 1 e 2). As reações mecânicas para o PPD aviário e o PPD bovino variaram entre 1,12 e 2,27mm, e 0,24 e 1,12mm (Tabela 3).

Os intervalos de confiança, onde a variação da resposta à tuberculina bovina é maior que à aviária, permaneceram entre 0,80 e 4,36 mm (Tabela 2). A média da

reação homóloga ao PPD bovino é de 4,79 mm e a heteróloga ao PPD aviário é de 2,21 mm (Tabela 2).

Observado o comportamento das reações ao PPD bovino, os limites dos intervalos de confiança, inferior e superior, das reações mecânicas situaram-se entre 0,24 e 1,12 mm, com média de 0,68 mm (Tabela 3). Aqueles obtidos para as reações heterólogas situaram-se entre 0,72 e 2,20 mm, com média de 1,46 mm (Tabela 1) e os das reações homólogas entre 2,49 e 7,09 mm, com média de 4,79 mm (Tabela 2). As medidas obtidas para as reações homólogas foram distintas, havendo, todavia superposição do intervalo dos valores obtidos para as reações mecânicas e heterólogas.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A avaliação histológica dos cortes das amostras de pele da região cervical, colhidos antes da aplicação das tuberculinas e corados pela Hematoxilina-Eosina, não apresentaram alterações histopatológicas (Figura 1).

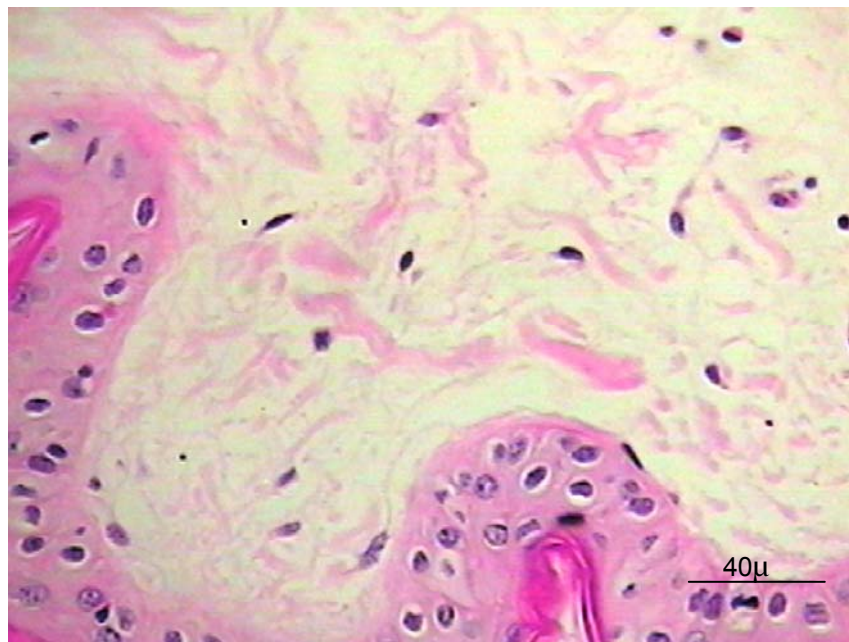


Figura 1 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal controle, antes da injeção das tuberculinas. Notar a ausência de alterações histopatológicas. HE

A avaliação da pele dos ovinos do grupo controle, das regiões onde se provocou as reações mecânicas, colhida às 96 horas após a inoculação dos PPDs, revelou a ausência de infiltrado inflamatório (Figuras 2 e 3).

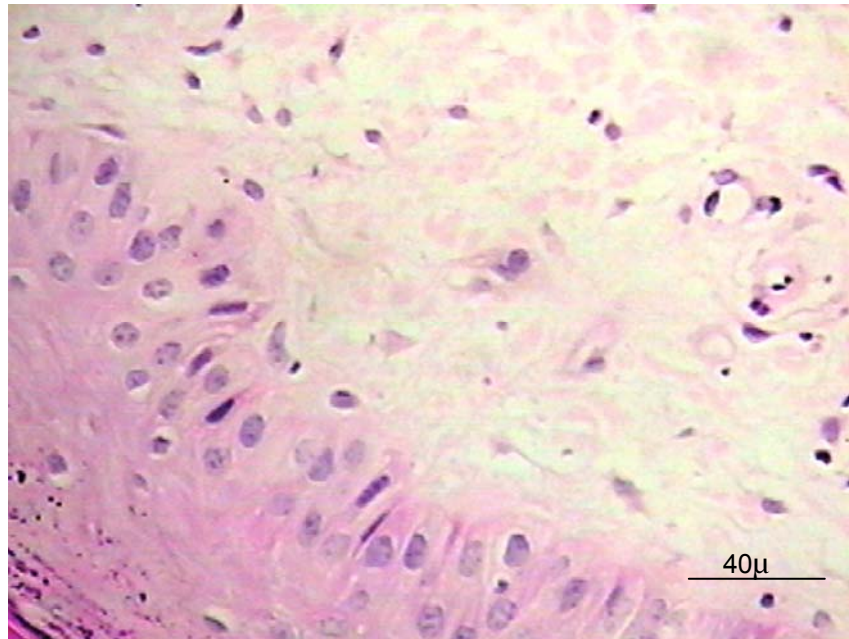


Figura 2 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal controle, no local de aplicação do PPD aviário, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a presença das estruturas epidérmicas sem alteração. HE

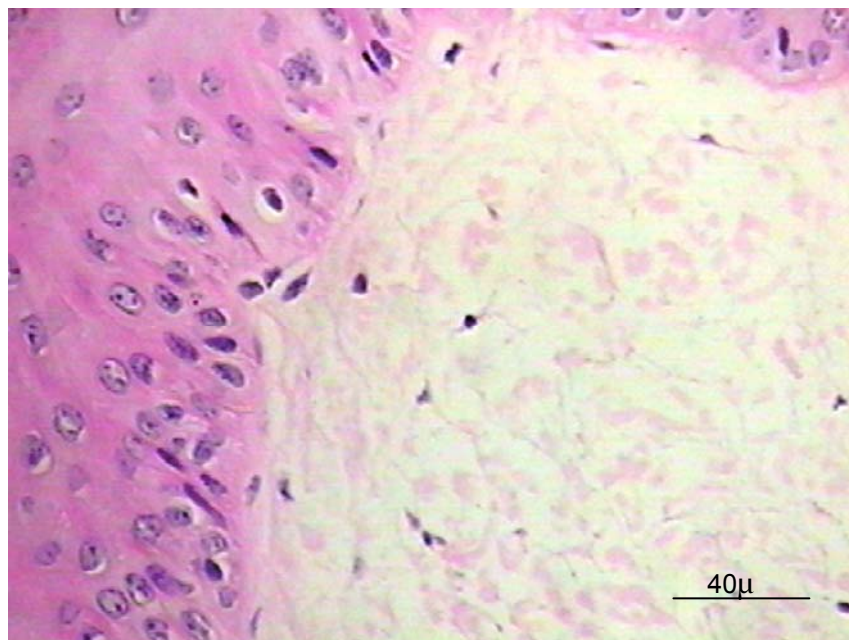


Figura 3- Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal controle, no local de aplicação do PPD bovino, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar as camadas da epiderme sem alterações. HE

No tocante às amostras de pele de locais onde ocorreram as reações tuberculínicas heterólogas, colhidas às 96 horas após a aplicação dos PPDs (Figuras 4 e 5), à histologia foram constatadas a presença discreta de células inflamatórias mononucleares.

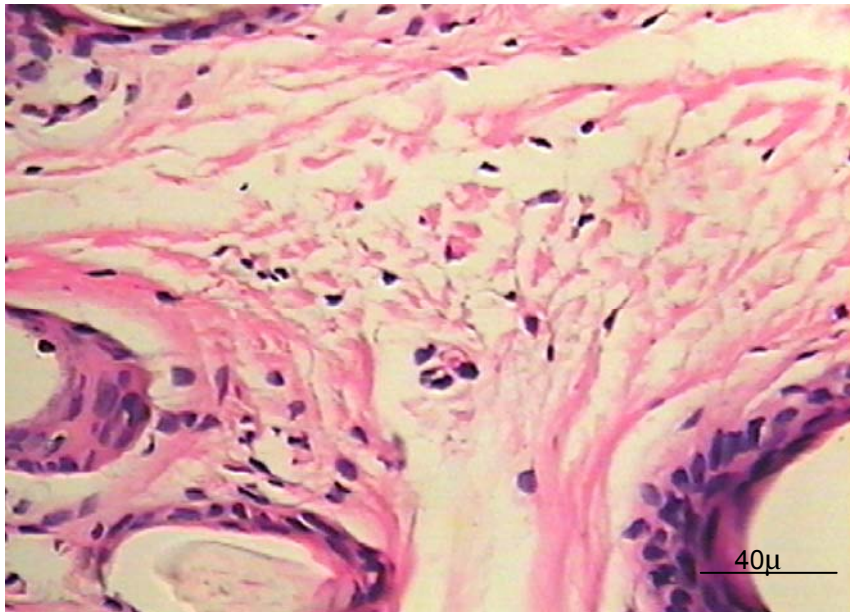


Figura 4 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal sensibilizado com *M. avium*, no local de aplicação do PPD bovino, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a presença de reação discreta com infiltrado inflamatório predominantemente de células mononucleares. HE

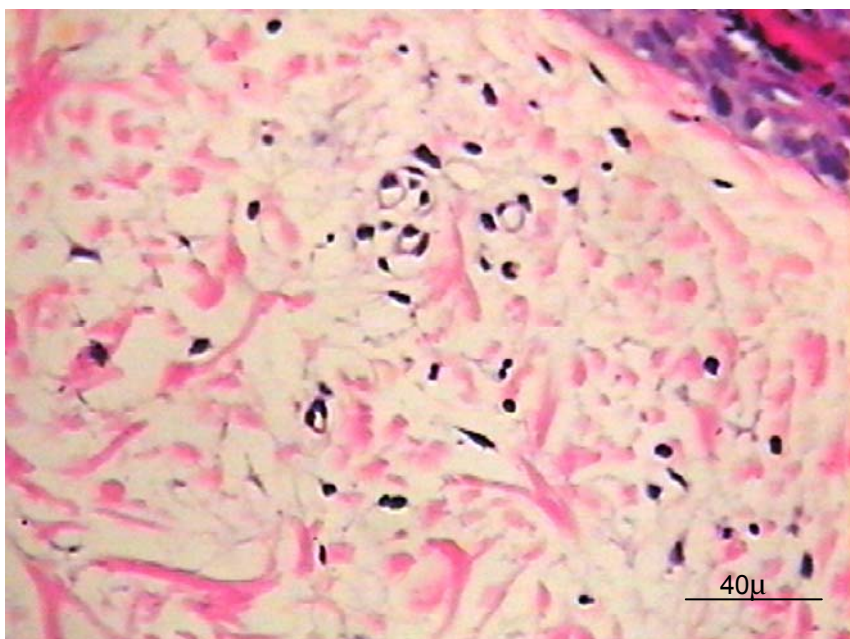


Figura 5 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal sensibilizado com *M. bovis*, no local de aplicação do PPD aviário, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a presença discreta de células inflamatórias mononucleares. HE

De forma diversa às observações histológicas anteriores, nos locais onde ocorreram as reações homólogas, em amostras de pele colhidas às 96 horas após a aplicação dos PPDs, constatou-se quadro histopatológico que caracterizou-se por intenso infiltrado inflamatório, constituído, preferencialmente, por células mononucleares (Figuras 6 e 7).

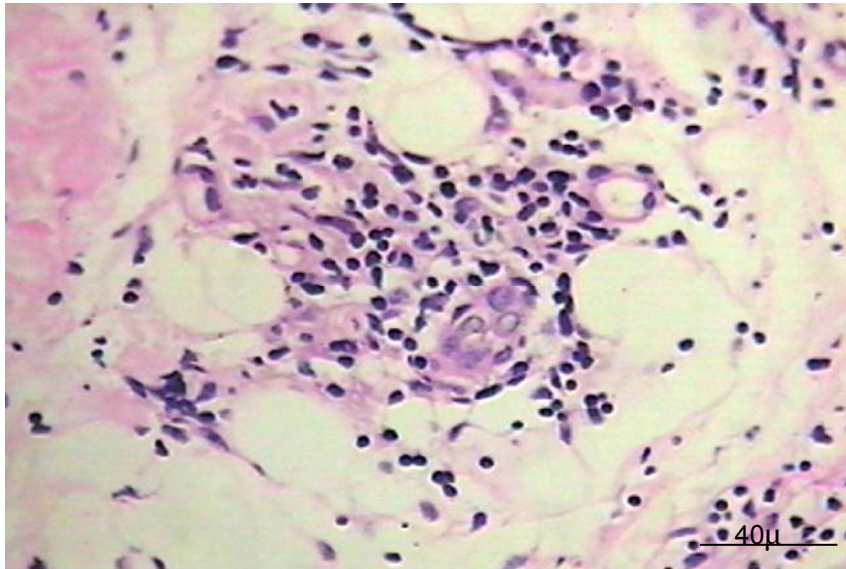


Figura 6 - Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal sensibilizado com *M. avium*, no local de aplicação do PPD aviário, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a predominância de células mononucleares, com reação inflamatória moderada, caracterizando a presença de edema. HE

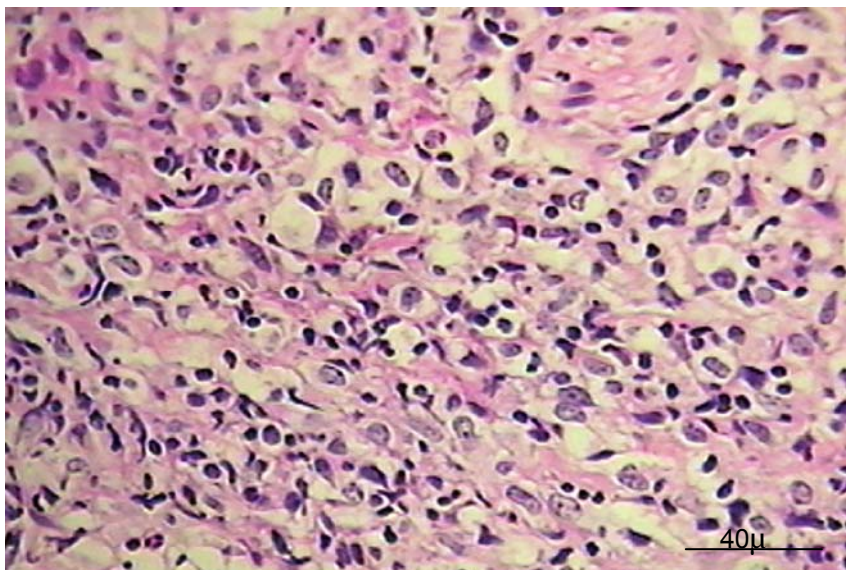


Figura 7- Corte histológico de pele proveniente da região cervical média de animal sensibilizado com *M. bovis*, no local de aplicação do PPD bovino, 96 horas após a injeção da tuberculina. Notar a presença de reação inflamatória, congestão, hemorragia, e intenso infiltrado de células inflamatórias mononucleares. HE

5 DISCUSSÃO

A tuberculose foi considerada por muito tempo rara nos ovinos, acreditando-se na resistência natural dessa espécie à infecção causada pelo *Mycobacterium* ssp (BARTON; ACLAND, 1973; CORDES et al., 1981; CRAIG; DAVIES, 1938; CREECH, 1940; HIEPE, 1972; LUKE, 1958; RADOSTITS et al., 2002; SMITH, 2006; THOEN, 1988). Como mencionado na revisão de literatura, este fato pode ser atribuído a diversos fatores, sendo um deles o sistema de manejo ao qual as diferentes espécies de ruminantes estão submetidas (GRIFFITH, 1928; JENSEN; SWIFT, 1982).

Os ovinos podem adquirir a enfermidade quando em contato com animais doentes, sejam eles bovinos, bubalinos, caprinos, ou animais silvestres (ALLEN, 1988; DAVIDSON; ALLEY; BEATSON, 1981; FOULERTON, 1902; M'FADYEAN, 1902;1900).

Há relatos da ocorrência da enfermidade em ovinos em países como EUA, Inglaterra, Nova Zelândia, África, Irlanda, Alemanha e Brasil, sendo o diagnóstico da tuberculose realizado através de achados de lesões típicas em necropsias, análises histopatológicas e bacteriológicas, levantamentos da doença em inspeção nos abatedouros e por meio do teste tuberculínico (BARTON; ACLAND, 1973; CORDES et al., 1981; CRAIG; DAVIES, 1938; CREECH, 1940; DAVIDSON; ALLEY; BEATSON, 1981; FOULERTON, 1902; LUKE, 1958; MARSH, 1965; M'FADYEAN, 1902; MURPHY, 1935; SMITH, 2006; WHITTY; DEMPSEY, 1974).

A tuberculose causada pelo *Mycobacterium bovis* tem sido diagnosticada em grande escala nos animais ruminantes, afetando a capacidade de produção, e por

conseqüência interferindo na saúde dos seres humanos consumidores de produtos de origem animal (KANTOR; RITACCO, 1994; LUKE, 1958).

A tuberculose ovina, quanto aos agentes causais e sua patogenicidade, à forma clínica de apresentação, freqüência, aspectos epidemiológicos e zoonóticos, apresenta uma grande semelhança (61%) com a tuberculose bovina (HIEPE, 1972; JENSEN; SWIFT, 1982; MALONE et al., 2003; MARSH, 1965).

O teste tuberculínico na espécie ovina vem sendo utilizado a alguns anos com base nas recomendações de execução e interpretação destinados a bovinos ou sem critérios de execução e valores padrões claramente estabelecidos para interpretação da prova nestes pequenos ruminantes, utilizando-se assim, qualquer aumento na espessura da pele, como evidencia suficiente para que esses animais sejam considerados reativos a prova, e positivos para a presença da tuberculose (CORDES et al., 1981; DAVIDSON; ALLEY; BEATSON, 1981; HIEPE, 1972; LUKE, 1958). Na literatura considerada, Hiepe (1972), Jensen e Swift (1982) e Malone et al. (2003) afirmavam que o teste tuberculínico poderia ser utilizado no diagnóstico e triagem de ovinos suspeitos de tuberculose. Ressaltavam ainda, que a prova em ovinos tem a mesma importância diagnóstica e limitações que quando usada nos bovinos, bubalinos e caprinos.

As pesquisas disponíveis que descrevem a doença na espécie ovina em geral utilizavam padrões de interpretação destinados aos bovinos, sendo raros os estudos que tratavam da padronização do teste tuberculínico nessa espécie (MALONE et al., 2003). No Brasil, inexistem padrões estabelecidos para a prova de tuberculina nos ovinos, não se dispondo de dados sobre a freqüência da tuberculose ovina que justifiquem a implantação de medidas específicas, visando o controle sistemático da enfermidade nesta espécie (MAPA, 2004). Em adição, existem autores que não

consideram a tuberculose em pequenos ruminantes problemática (ALLEN, 1988). Todavia, em países que registrem a enfermidade nesses ruminantes deveria recomendar-se a inclusão desses animais em programas de controle e erradicação da tuberculose, pois poderiam funcionar como fonte de infecção para a espécie bovina (LIÉBANA et al., 1998), justificando-se a proposição deste trabalho.

Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa pode-se afirmar que os ovinos sensibilizados experimentalmente e aqueles do grupo controle, não apresentaram alterações em suas funções vitais (frequências respiratória, dos batimentos cardíacos e ruminais, e temperatura corpórea) quando submetidos ao alergoteste. Atribui-se este comportamento ao fato do teste tuberculínico ser baseado em uma reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV), em geral sem manifestações sistêmicas e caracterizada por uma resposta inflamatória no local da aplicação da tuberculina (FERRI; CALICH; VAZ, 1977; TIZARD, 2000).

As reações tuberculínicas obtidas com o uso de PPD bovino e aviário mostraram-se específicas quanto à sensibilização com cepas padrões de *M. bovis* e *M. avium*, permitindo a distinção entre reações mecânicas, heterólogas e homólogas (Tabelas 1, 2 e 3).

A reação tuberculínica medida através do aumento da espessura de pele atingiu maior magnitude às 48 horas após a injeção da tuberculina, porém não houve diferença estatística em relação à observada às 72 horas (± 6 horas). A evolução da intensidade da reação observada esta em concordância com as afirmações de Tizard (2000), que destacam que os animais infectados por *M. bovis* apresentam uma resposta inflamatória que poderia atingir maior intensidade entre 24 a 72 horas após o desencadeamento. De forma diversa, Sahoo (1951) e Roxo (1996), em seus trabalhos, respectivamente, com bovinos e bubalinos, determinaram

que a reação apresentava uma maior intensidade às 72 horas. Da mesma forma que no presente estudo Suther, Franti e Page (1974) não encontraram variação na resposta tuberculínica em bovinos, observadas às 48 e 72 horas. Silva (2004), por sua vez, em seu estudo em caprinos, determinou que o momento de maior intensidade foi constatado às 48 horas, todavia sem diferença estatística em relação aquela observada às 72 horas (± 6 horas). Deve-se dar destaque que a maioria dos autores que trabalharam com a espécie bovina utiliza 72 horas (± 6 horas) como momento padrão para a leitura do teste tuberculínico (DUFFIELD; NORTON; STREETEN, 1985; GONZÁLEZ LLAMAZARE et al., 1999; LESSLIE; HEBERTY, 1975; RAGASSA; AMENI, 2001; SUTHER; FRANTI; PAGE, 1974), e que o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, através do PNCEBT, recomenda que a leitura do teste tuberculínico, em bovinos e bubalinos, seja também realizada às 72 horas (± 6 horas) após a aplicação da tuberculina (MAPA, 2004).

Em relação aos ovinos, o momento ideal para a leitura da reação à tuberculina, obedece a mesma tendência de realização às 72 horas, considerando-se os trabalhos de Robinson (1955), Davidson, Alley e Beatson (1981) e Malone et al. (2003), enquanto, Hiepe (1972) e Cordes et al. (1981) adotavam como momento padrão de leitura das 72 as 96 horas. Os resultados obtidos neste estudo, por apresentarem valores semelhantes estatisticamente às 48 e 72 horas, permitem a adoção do último tempo como aquele a ser usado para a leitura do Teste Cervical Comparativo (TCC).

O teste tuberculínico apresenta limitações, porém tem sido o procedimento diagnóstico adotado em PNCEBT (MAPA, 2004), pois seu uso tem facilitado a erradicação da tuberculose em diversos países (CORDES et al., 1981; HIEPE, 1972; MONAGHAN et al., 1994).

Considerando-se os valores obtidos nas tabelas 1, 2 e 3, com relação à reação ao PPD bovino, no teste intradérmico simples na região cervical, às 72 horas, pode-se interpretar para ovinos uma reação como: negativa, com a observação de aumento de espessura de pele inferior a 1,00 mm ; inconclusiva, quando o aumento estiver entre 1,00 e 2,48 mm, e positiva quando for maior ou igual a 2,49 mm. Estes valores recomendados para a interpretação dos resultados do teste intradérmico simples, na região cervical, foram diferentes daqueles determinados por outros autores. Assim sendo, Hiepe (1972) usou a seguinte interpretação para o teste intradérmico simples na região cervical: negativo, se a espessura da pele for inferior a 1,4 mm; inconclusivo, com aumento entre 1,5 a 3,0 mm, e positivo quando o aumento for superior a 3,0mm. Por sua vez, Cordes et al. (1981) consideraram exclusivamente uma reação como positiva, quando a resposta for maior ou igual a 2 mm. Essa diversidade de recomendações por si só, valorizam o objetivo desta pesquisa e o acerto em se buscar o estabelecimento de padrões de interpretação particulares aos diferentes países, considerando as condições epidemiológicas em que são criados os animais, em especial manejo e ambiente.

O teste cervical comparativo, por sua vez, é utilizado para a eliminação de reações inespecíficas e possível confirmação de positividade de animais que apresentaram uma reação inconclusiva ou positiva, ao PPD bovino, no teste intradérmico simples na região cervical. Cordes et al. (1981) em trabalho realizado com ovinos, na Nova Zelândia, determinaram uma especificidade de 99,6% e uma sensibilidade de 81,6%, na utilização do teste intradérmico simples na região interna da coxa, considerando animais com aumento de espessura de pele superior a 2mm como positivos para a tuberculose.

No Brasil, a linfadenite caseosa dos ovinos, causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é importante para os ovinocultores, pois está disseminada nas criações devendo ser diferenciada da tuberculose, visto que, Riet-Corrêa et al. (2001), relatavam uma alta prevalência da linfadenite caseosa em ovinos com valores de 50 a 60%. Este fato reforça a importância da realização do teste tuberculínico como prova de rotina em pequenos ruminantes, com a finalidade de fazer-se o diagnóstico diferencial da linfadenite caseosa com a tuberculose, em função de ser um teste de alta especificidade.

Considerando-se os resultados obtidos no teste cervical comparativo, ao avaliar o grupo B (animais sensibilizados com *M. bovis*) no qual observou-se que a média da reação homóloga bovina e aquela da reação heteróloga aviária, respectivamente, foram de 4,79 mm e de 2,21 mm, permitindo estabelecer uma relação entre as duas magnitudes médias de cerca de 2:1. Os intervalos de confiança, inferior e superior dos resultados das diferenças entre os PPDs bovino e aviário, permaneceram entre 0,80 e 4,36 mm. Diante destes resultados, pode-se afirmar que um animal é **negativo** à infecção pelo *M. bovis*, quando a reação ao PPD bovino for menor que ao aviário ou > em até 0,99mm; **inconclusivo**, quando a reação ao PPD bovino for maior que aquela ao aviário com aumento entre 1,00 a 1,99 mm e **positivo**, quando a reação ao PPD bovino for superior àquela aviária em pelo menos 2,0 mm.

Malone et al. (2003) utilizando o padrão estabelecido para bovinos consideravam uma reação positiva, quando a resposta ao PPD bovino, fosse superior ao aviário em pelo menos 5mm. Desta forma, o resultado obtido neste experimento, para o teste cervical comparativo, considerando a reação positiva à infecção por *M. bovis*, foi inferior ao valor utilizado como padrão por Malone et al.

(2003). Confirmando-se a necessidade de estabelecimento de valores de referência para cada espécie animal nos diferentes países.

Para o controle e erradicação da tuberculose animal, além dos bovinos e bubalinos, deveria destacar-se também a importância da realização do teste tuberculínico em outras espécies animais ruminantes de produção, como caprinos e ovinos, além dos ruminantes silvestres, pois estes espécimes poderiam atuar como fonte de infecção da tuberculose para os bovinos, evitando também que seres humanos consumidores de seus produtos e subprodutos, fossem afetados pela enfermidade. Preocupados com a questão da disseminação da tuberculose em animais ruminantes e com a possibilidade de funcionarem como fonte de infecção para os bovinos, Roxo et al. (1998) estabeleceram um padrão de interpretação para o teste tuberculínico em búfalos e Silva et al (2006) com o uso de animais experimentalmente sensibilizados pode propor padrão de valores limites para a interpretação do teste tuberculínico em caprinos. Em animais silvestres ruminantes, com o uso de um padrão estabelecido experimentalmente por Corrin et al. (1987), Mackintosh et al. (2004) realizaram o teste tuberculínico em cervos (*Cervus elaphus*), diagnosticando os animais como positivos a prova de tuberculina quando apresentassem aumento na espessura da pele em pelo menos 2mm.

Os resultados encontrados neste experimento, a partir dos quais propõe-se um padrão de interpretação para o teste tuberculínico (intradérmico simples na região cervical e o cervical comparativo) realizado em ovinos, vem de encontro a essas necessidades, representando importante ferramenta a ser utilizada no controle da tuberculose.

Os valores padrões recomendados pelo MAPA (2004), no PNCEBT para realizar a leitura e interpretação dos resultados obtidos no teste cervical comparativo

em bovinos apresentam medidas limites para positividade que são superiores às estabelecidas para os ovinos neste experimento. A simples utilização destes limites de bovinos para ovinos determinaria a aparente negatividade de ovinos à presença da tuberculose, invalidando o uso desses padrões de interpretação do teste tuberculínico estabelecidos nestes grandes ruminantes para os ovinos. Tal fato pode ser verificado quando se considera os valores padrões de interpretação estabelecidos para caprinos por Silva et al. (2006), os quais apresentam-se também inferiores àqueles de bovinos, considerando animais positivos quando o aumento da espessura da pele for igual ou superior a 2,50mm, tendo também uma pequena diferença em relação aos valores padrões encontrados neste experimento para ovinos (animais positivos quando o aumento da espessura da pele for igual ou superior a 2,00mm), indicando também não ser recomendável a utilização dos valores de interpretação de bovinos ou de caprinos para a realização do teste tuberculínico nos ovinos.

Na avaliação histopatológica a resposta tuberculínica, verificou-se que os animais sensibilizados com cepas homólogas apresentaram um infiltrado inflamatório no local da reação, predominantemente constituído, por células mononucleares. Esses achados estão de acordo com aqueles verificados por: Roxo (1996) em bubalinos; Silva et al. (2006) em caprinos e Doherty et al. (1996) e Feldman e Fitch (1937) em bovinos. Lisle et al. (1983), na Nova Zelândia, em estudo realizado em cervos observaram também a presença dessas células inflamatórias mononucleares, após 72 horas, no local da reação, corroborando com os achados deste experimento.

6 CONCLUSÕES

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

1 – o teste tuberculínico não provocou reações adversas, avaliadas através de variações das funções vitais ou do estado geral, nos ovinos sensibilizados ou não com as amostras padrões das micobactérias;

2 – a resposta dos ovinos ao teste tuberculínico induzido pelo PPD bovino foi mais intensa nos animais sensibilizados pela cepa padrão de *M. bovis* do que naqueles que o foram pela cepa padrão de *M. avium* ou não sensibilizados, tendo um aumento da espessura da pele em média duas vezes superior àquele induzido pelo PPD aviário;

3 – diante dos resultados semelhantes pode-se recomendar que a leitura do resultado do alérgoteste à tuberculina em ovinos sensibilizados experimentalmente pela cepa padrão de *M. bovis*, seja realizada às 48 ou 72 horas (± 6 horas) após a tuberculinização;

4 - no teste intradérmico simples, realizado na região cervical de ovinos sensibilizados pela cepa padrão de *M. bovis*, os resultados medidos pelo aumento da espessura de pele às 72 horas (± 6 horas) permitiram concluir que o animal tem

reação: **negativa**, quando o aumento for < que 1,00 mm; **inconclusiva**, quando entre 1,00 e 2,48 mm e **positiva** quando $\geq 2,49$ mm;

5 – o padrão sugerido no teste cervical comparativo, permitiu concluir que a reação será considerada: **negativa** à infecção pelo *M. bovis*, quando a reação ao PPD bovino for menor que ao aviário ou > em até 0,99mm; **inconclusivo**, quando a reação ao PPD bovino for maior que aquela ao aviário com aumentos entre 1,00 e 1,99 mm e **positivo**, quando a reação ao PPD bovino for superior àquela ao aviário em pelo menos 2,00 mm e

6 - os ovinos sensibilizados com cepas padrões de micobactérias tiveram um maior aumento da espessura da pele, quando testados com o PPD homólogo, o que é compatível com os achados da avaliação histológica das reações tuberculínicas específicas, às 96 horas após a aplicação dos PPDs, caracterizadas pela presença de moderado a intenso infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares.

REFERÊNCIA*

ALLEN, G. M. Tuberculosis in sheep - a very rare disease. **Surveillance**, v. 15, n. 5, p. 8 - 9, 1988.

ANTUNES, J. L. F.; MORAIS, M. de; BIAZEVIC, M. G. H.; WALDMAN, E. A.; CORRÊA, M. O. A. Tuberculose e leite: elementos para a história de uma polêmica. **História, Ciência, Saúde- Manguinhos**, v. 9, n. 3, p. 609 - 629, 2002.

AYELE, W. Y.; NEILL, S. D.; ZINSSTAG, J.; WEISS, M. G.; PAVLIK, L. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **Institute Journal Tuberculosis Lung Disease**, v. 8, n. 8, p. 924 - 937, 2004.

BAIRD, G.; SYNGE, B.; DERCKSEN, D. Survey of caseous lymphadenitis seroprevalence in British terminal sire sheep breeds. **The Veterinary Record**, v. 154, n. 17, p. 505 - 506, 2004.

BARTON, M. D.; ACLAND, H. M. Mycobacterium avium serotype2 infection in a sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, n. 4, p. 212 - 213, 1973.

BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 37, n. 4, p. 485 - 504, 1997.

BENESI, F. J.; PINHEIRO, S. R.; MAIORKA, P. C.; BENITES, N. R.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L. Tuberculosis in goat in Brazil: case report. In: 24th WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2006, Nice – França. **Anais...1** CD-Rom.

BRITO, M. A.; GONZÁLEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 942 - 948, 2006.

BRITO, M. A. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo de ovinos leiteiros em confinamento**. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Patobiologia

* Conforme as diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses. 4ª ed. Rev. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 p.

Animal). - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2004.

BUDDLE, B. M.; MCCARTHY, A. R.; RYAN, T. J.; POLLOCK, J. M.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; ANDERSEN, P.; LISLE, G. W. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. **The Veterinary Record**, v. 153, n. 15, p. 615 - 620, 2003.

CARMICHAEL, J. Tuberculosis of sheep in Uganda. **The Veterinary Record**, v. 50, n. 36, p. 1138 - 1147, 1938.

CHAUHAN, H. V. S.; DWIVEDI, D. P.; CHAUHAN, S. S.; KALRA, D. S. Tuberculosis in animal in India - a review. **Indian Journal Tuberculosis**, v. 21, n. 1, p. 22 - 35, 1974.

COLLEMAN, J. D.; COOKE, M. M. Mycobacterium bovis infection in wildlife in New Zealand. **Tuberculosis**, v. 81, n. 3, p. 191 - 202, 2001.

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. 29, n. 4, p. 60 - 62, 1981.

CORRÊA, O. **Doenças infecciosas dos animais domésticos- Doenças causadas por bactérias e fungos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1975. v. 2, 234 p.

CORRIN, K. C.; CARTER, C. E.; KISSLING, R. C.; LISLE, G. W. Short Interval intradermal skin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*) inoculated with *Mycobacterium bovis*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 35, n. 12, p. 204 - 207, 1987.

COSTA, L. F. M. Corynebacterium pseudotuberculosis, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista Ciência Biológica**, v. 1, n. 1, p. 105 - 115, 2002.

CPZ- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. **Preparacion y estandarizacion de tuberculosis PPD**. Buenos Aires. OPAS/ OMS, 1980. p. 44, Nota técnica, n. 17, r. 1.

CRAIG, J. F.; DAVIES, G. O. Tuberculosis in sheep. **The Veterinary Record**, v. 50, n. 36, p.1156 - 1157, 1938.

CREECH, G. T. Bovine type of tuberculosis in sheep. **American Journal Veterinary Research**, v. 1/2, n. 1, p. 23 - 25, 1940.

DAVIDSON, R. M.; ALLEY, M. R.; BEATSON, N. S. Tuberculosis in a flock of sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 29, n. 1/2, p. 1 - 2, 1981.

DOHERTY, M. L.; BASSET, H. F.; QUINN, P. J.; DAVIS, W. C.; KELLY, A. P.; MONAGHAN, M. L. A sequential study of the bovine tuberculin reaction. **Immunology**, v. 87, p. 9 - 14, 1996.

DUFFIELD, B. J.; NORTON, J. H.; STREETEN, T. A. Application of the comparative cervical test to the identification of false positive reactions to the bovine tuberculin caudal fold test. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 12, p. 424 - 426, 1985.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Animal health**. Disponível em: <http://apps3.fao.org/vs/index.htm>. Acesso em: 20 jan. 2004.

FELDMAN, W. H.; BAGGENSTOSS, A. H. The residual infectivity of the primary complex of tuberculosis. **American Journal of Pathology**, v. 14, p. 473 - 490, 1938.

FELDMAN, W. H.; FITCH, C. P. The development of the local cellular reaction to tuberculin in sensitised calves. **American Journal of Pathology**, v. 13, p. 641 - 642, 1937.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 9 - 13, 1997.

FERRI, R. G.; CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C. **Imunologia**. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 1977, 317 p.

FOULERTON, A. G. R. A case of tuberculosis in a sheep. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 15, p. 102 - 104, 1902.

FRANCIS, J. **Tuberculosis in animals and man: a study in comparative pathology**. London: Cassell, 1958. 357p.

FRITSCHÉ, A.; ENGEL, R.; BUHL, D.; ZELLWEGER, J. P. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. **Institute Journal Tuberculosis Lung Disease**, v. 8, n. 7, p. 903 - 904, 2004.

GONZÁLEZ LLAMAZARES, O. R.; GUTIÉRREZ MARTIN, C. B.; ALVAREZ NISTAL, D.; PUENTE REDONDO, V. A.; DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; RODRIGUEZ FERRI, E. F. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 55 - 66, 1999.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotics aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1/2, p. 137 - 151, 1994.

GRAPHPAD SOFTWARE. **Instat guide**: www.graphpad.com. Cary: Graphpad Software, 1998. 1 CD-Rom.

GRIFFITH, A. S. Tuberculosis of the domesticated species of animals. **Journal of Comparative Pathology**, v. 41, p. 109 - 127, 1928.

GRIFFITH, A. S. tuberculosis of the sheep. **Journal of Comparative Pathology Therapeutics**, v. 38, p. 157 - 180, 1925

HARSHFIELD, G. S.; RODERICK, L. M. Avian tuberculosis of sheep. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 85, p. 597 - 610, 1934.

HARSHFIELD, G. S.; RODERICK, L. M.; HAWN, M. C. Avian tuberculosis. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 91, p. 323 - 329, 1937.

HIEPE, H. T. **Enfermedades de la oveja**. Zaragoza: Acribia, 1972. 391p.

HIPOLITO, O.; FREITAS, M. G.; FIQUEIREDO, J. B. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. Minas Gerais. Melhoramentos, 1965. 596 p.

HUTYRA, F.; MAREK, J.; MANNIGER, R. **Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos**. Barcelona. Labor, S.A, 1968, 872 p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados, quantidade de animais de 1997 a 2002.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 20 jan. 2004.

JENSEN, R.; SWIFT, B. L. **Diseases of the respiratory system:** In disease of sheep. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. 330 p.

JOWETT, W. Two cases of tuberculosis in sheep. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 41, p. 255 - 258, 1928.

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

KOCH, R. The etiology of tuberculosis 1882. **American Review of Tuberculosis**, v. 3, p. 221 - 230, 1932. Disponível em: <<http://www.asm.org/ASM/files/CCLIBRARYFILES/FILENAME/000000228/1882p109.pdf>>. Acesso em 10 ago. de 2005.

KUMMENEJE, K.; FODSTAD, F. H. A case of avian tuberculosis in sheep. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 17, n. 3, p. 286 - 292, 1976.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; COSTA, S. G. Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 27 - 32, 1987.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n. 1/2, p. 1 - 7, 1989.

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.

LESSLIE, I. W.; HEBERTY, C. N. Comparasion of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. 3- National trial in Great Britan. **The Veterinary Record**, v. 96, p. 338 - 341, 1975.

LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; URQUÍA, J. J.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 1, p. 50 - 53, 1998.

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

LISLE, G. W.; WELCH, P. J.; HAVILL, P. F.; JULIAN, A. F.; POOLE, W. S. H.; CORRIN, K. C.; GLADDEN, N. R. Experimental tuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 31, p. 213 - 216, 1983.

LUKE, D. Tuberculosis in the horse, pig, sheep and goat. **The Veterinary Record**, v. 70, n. 26, p. 529 - 535, 1958.

M'FADYEAN, J. A case of Tuberculosis in a sheep. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 15, p. 158 - 159, 1902.

M'FADYEAN, J. Tuberculosis of the sheep. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 13, p. 59 - 60, 1900.

MACKINTOSH, C. G.; LISLE, G. W.; COLLINS, D. M.; GRIFFIN, J. F. T. Mycobacterium diseases of deer. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 52, n. 4, p. 163 - 174, 2004.

MALONE, F. E.; WILSON, E. C.; POLLOCK, J. M.; SKUCE, R. A. Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle, **Journal Veterinary Medical**, v. 50, p. 500 - 504, 2003.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa SDA nº 6 de 8 de janeiro de 2004. Regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, 2004.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2005.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 87 da secretaria de Defesa Agropecuária, de 10 de dezembro de 2004. Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO).** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2005.

MARSH, H. **Newsom's sheep diseases**, 3. ed. Baltimore: the williams & wilkins company, 1965. 456 p.

MARTIN, W. B.; AITKEN, I. D. **Tuberculosis in sheep: In Diseases of sheep**. 3 ed. Editora: Blackwell Science, p. 147 - 148, 2000.

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.

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

MURPHY, J. M. Case of tuberculosis (bovine type) in a sheep in Ireland. **The Veterinary Record**, v. 15, n. 49, p.1488 - 1489, 1935.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1/4, p. 41 - 52, 1994.

PATON, M. W.; BULLER, N. B.; ROSE, I. R.; ELLIS, T. M. Effect of the interval between shearing and dipping on the spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, n. 8, p. 494 - 496, 2002.

PEETERS, R.; BUYS, N.; ROBIJNS, L.; VANMONTFORT, D.; VAN ISTERDAEL, J. Milk yield and milk composition of Flemish Milksheep, Suffolk and Texel ewes and their crossbreds. **Small Ruminant Research**, v. 7, p. 279 - 288, 1992.

PGESP - PORTAL DO GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, **Decreto nº 45.781, de 27 de abril de 2001**. Disponível em:<<http://www.cda.sp.gov.br/>>. Acesso em: 10 de jan. 2006.

PGESP - PORTAL DO GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, **Programa Estadual de Sanidade dos Caprinos e Ovinos**. Disponível em:<<http://www.cda.sp.gov.br/>>. Acesso em: 10 de jan. 2006.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 357-399, 1988.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. 513 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. 1737 p.

RAGASSA, A. Y.; AMENI, G. Sensitivity and especificity of a single intradermal tuberculin test at the cervical and caudal folds in zebu cattle in Ethiopia. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 71, n. 4, p. 325 - 327, 2001.

RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela. 2001. v. 1, 425 p.

ROBINSON, E. M. Tuberculosis in sheep and goats. **Journal South Africa Veterinary Medical Association**, v. 26, n. 2, p. 95 - 104, 1955.

ROBINSON, R. A. Synfosium on sheep and goat medicine. **The Veterinary Clinics of North America- Large animal Practice**, v. 5, n. 3, p. 500 - 502, 1983.

ROXO, E. **Avaliação da resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina em Bubalinos (*Bubalus bubalis*)**. 1996. 55 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1996.

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

SAHOO, B. N. Tuberculosis and tuberculin with special reference to PPD tuberculin- a review. **Indian Veterinary Journal**, v. 27, n. 5, p. 319 - 331, 1951.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2 ed., Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

SANTOS, R. Ovinocultura- tendência mundial. **O berro**, n. 91, p. 42 - 48, 2006.

SAS –STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistics versão 4.0. Cary: SAS Institute, 2000. 956 p.

SEVA, J.; MENCHÉN, V.; NAVARRO, J. A.; PALLARÉS, F. J.; VILLAR, D.; VÁSQUEZ, F.; BERNABÉ, A. Caprine tuberculosis eradication program : an immunohistochemical study. **Small Ruminant Research**, v. 46, n. 2, p. 107 - 114, 2002.

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

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

SMITH, B. P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2006, 1728 p.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Goat medicine**. 1. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1994. 620 p.

STUBBS, E. L.; LIVE, M. A. I. A case of sheep tuberculosis due to the bovine type. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 95, p.173 - 176, 1939.

SUTHER, B. E.; FRANTI, C. E.; PAGE, H. H. Evaluation of a comparative intradermal tuberculin test in California dairy cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 35, n. 3, p. 379 - 387, 1974.

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

TIZARD, I. R. **Introdução a imunologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca, 2002. 532 p.

VASCONCELOS, V. R.; VIEIRA, L. S. A evolução da caprino-ovinocultura brasileira. **O berro**, n. 53, p.100 - 101, 2002. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2004.

WHITING, T. L.; TESSARO, S. V. An abattoir study of tuberculosis in a herd of farmed elk. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 497 - 501, 1994.

WHITTY, B. T.; DEMPSEY, D. Generalised tuberculosis in a sheep. **Irish Veterinary Journal**, v. 28, n. 11, p. 241 - 242, 1974.

WHO – **World Health Organization**. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 25 fev. 2006.