

INFLUÊNCIA DA REGIÃO CORPÓREA NO DIAGNÓSTICO IMUNOALÉRGICO DA TUBERCULOSE CAPRINA*

João Gabriel Zerba Corrêa¹
Sônia Regina Pinheiro²
Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota³
Laura Cristina Sant'Anna Henriques¹
Juliana Silva Nogueira¹
Camila Freitas Batista¹
Danielle Massukado Rodrigues S. Yuri¹
Fernando José Benesi¹

RESUMO

Foi avaliada a resposta imunoalérgica ao derivado protéico purificado (PPD) bovino, administrado pela via intradérmica em diferentes regiões da superfície corpórea de caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados com *Mycobacterium bovis* estirpe AN₅. Foram utilizados 20 caprinos adultos clinicamente sadios dos quais 14 animais constituíram o grupo experimental, que recebeu o PPD bovino em diferentes regiões do corpo (cervical cranial, cervical caudal, torácica ventral, torácica dorsal, abdominal ventral, abdominal dorsal e prega da cauda) e seis do grupo controle, inoculados com solução fisiológica. Os caprinos foram monitorados por exames clínicos e mensurações da reação ao PPD efetuadas com cutímetro de mola, 24h antes, 0h, 24h, 48h, 72h e 96 horas após aplicação. A análise dos resultados obtidos constatou que os maiores aumentos de espessura da pele foram registrados nas regiões abdominal dorsal, torácica dorsal e cervical caudal às 24h, 48h e 72 horas de aplicação. Na prega da cauda, região torácica ventral e abdominal ventral, os aumentos da espessura da pele foram inferiores aos observados nas outras regiões ($p < 0,05$). A análise do conjunto dos resultados recomenda que nos caprinos, o teste imunoalérgico simples da tuberculose deva ser efetuado com leitura após 72 horas da aplicação e o PPD administrado via intradérmica, preferencialmente na região abdominal dorsal, torácica dorsal ou cervical caudal.

Palavras-chave: caprinos, tuberculinização, PPD, região corpórea.

BODY REGION INFLUENCE ON TUBERCULOSIS IMMUNE ALLERGIC DIAGNOSIS IN GOATS

ABSTRACT

Allergic immune response was evaluated applying bovine purified protein derivative (PPD), intradermally injected on different body regions surface of goats (*Capra hircus*) experimentally sensitized to *Mycobacterium bovis* strain AN₅. It was used 20 clinically

* Auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

¹ Depto Clínica Médica - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - São Paulo (SP)

² Profa. Associada do Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - São Paulo (SP)

³ Pesquisador do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Pedro Leopoldo, MG, Brasil

Correspondência para: Dr. Fernando José Benesi - E-mail: febencli@usp.br - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil

healthy adult goats, of which 14 animals constituted the experimental group, receiving the bovine PPD in different body regions (cranial cervical, caudal cervical, ventral thoracic, dorsal thoracic, ventral abdominal, dorsal abdominal and tail fold), and six animals were inoculated with saline as control group. The goats were monitored by clinical examinations and PPD's measurements made with skin fold calipers, 24h before, 0h, 24h, 48h, 72h and 96 hours after application. The results obtained showed that the highest increases of skin thickness were found on the abdominal dorsal, thoracic dorsal and caudal cervical regions at 24h, 48h and 72 hours of application. In the tail fold and the ventral thoracic and abdominal regions, increases of skin thickness were lower than observed on other regions ($p < 0.05$). The analysis of all results recommend that the simple allergic immune test for tuberculosis in goats, should be measured after 72 hours of application and PPD should be intradermally injected predominantly in dorsal abdominal, thoracic dorsal or caudal cervical regions.

Key words: goat, tuberculin test, PPD, body region.

INFLUENCIA DE LA REGIÓN DEL CUERPO EN EL DIAGNOSTICO INMUNE ALÉRGICO DE LA TUBERCULOSIS EN CAPRINOS

RESUMEN

Se evaluó la respuesta inmune alérgica a la aplicación del derivado proteico purificado (PPD) bovino, administrado por vía intradérmica en diferentes regiones de la superficie corporal de los caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados con el *Mycobacterium bovis* cepa AN5. Se utilizaron 20 caprinos adultos clínicamente sanos, de los cuales 14 animales constituyeron el grupo experimental, que recibió el PPD bovino en diferentes regiones corporales (cervical craneal, caudal ventral cervical, torácica ventral, torácica dorsal, abdominal ventral, abdominal dorsal y pliegue caudal) y seis del grupo control, fueron inyectados con solución salina. Los caprinos fueron monitoreados por exámenes clínicos y se hicieron mensuraciones de la reacción a la PPD con cutímetro de mola, 24h antes, 0h, 24h, 48h, 72h y 96 horas después de la aplicación. El análisis de los resultados obtenidos constató que los mayores incrementos de grosor de la piel fueron registrados en las regiones abdominal dorsal, torácica dorsal y cervical caudal a las 24h, 48h y 72 horas después de la aplicación. En el pliegue caudal, región torácica ventral y abdominal ventral los incrementos del grosor de la piel fueron inferiores a los observados en las demás regiones ($p < 0,05$). El análisis del conjunto de los resultados llevó a la recomendación de que en los caprinos, el test inmune alérgico simple de la tuberculosis debe hacerse con lectura a las 72 horas después de la aplicación y el PPD administrado por vía intradérmica, preferencialmente en las regiones abdominal dorsal, torácica dorsal o cervical caudal.

Palabras clave: caprinos, tuberculinización, PPD, región del cuerpo

INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis tem sido considerado o principal agente etiológico da tuberculose em caprinos, ovinos, suínos, animais de zoológico e de vida selvagem (1-3). Nos caprinos a doença é usualmente causada pelo *M. bovis*, entretanto já foram relatados isolamentos do *M. tuberculosis* (2) e o *M. avium* (4) nestas espécies.

A tuberculose em caprinos ocorre usualmente em rebanhos que pastejam com bovinos infectados (5). Quando a tuberculose bovina é diagnosticada, outras espécies de animais

domésticos contactantes com os animais infectados também devem ser examinadas, pois podem ter adquirido a infecção por *M. bovis* (5).

No Brasil é freqüente a utilização do leite de vaca cru para a alimentação de cabritos, pois o leite das cabras costuma ser destinado à produção de queijos. Esta prática pode favorecer a transmissão de agentes infecciosos dos bovinos para os caprinos, fato este já documentado no início do século passado por Griffith (6) ao relatar o diagnóstico da tuberculose em caprino amamentado com leite de vacas tuberculosas.

A ocorrência da tuberculose nos caprinos faz desta espécie uma possível fonte de infecção para os humanos e outros animais; e deve ser considerada nos programas de erradicação da tuberculose (7).

No Brasil, os registros sobre a ocorrência da tuberculose caprina são escassos. Contudo, o controle da doença utilizando a tuberculinização como método de diagnóstico consta entre as exigências para a produção de leite de cabra (8).

Silva et al. (9) padronizaram a interpretação da prova da tuberculina dupla comparada em caprinos experimentalmente sensibilizados com *M. bovis* e *M. avium* e verificaram que os valores observados diferiam dos atualmente recomendados no Brasil, para a espécie bovina (8). Com base nesta investigação recomendaram que para os caprinos a prova requer interpretação específica, de maneira similar ao proposto por Roxo et al. (10) para os bubalinos.

Considerando que a intensidade da resposta imunoalérgica à tuberculina varia conforme a região corporal em que o antígeno é administrado (11) e que ainda não foram efetuados estudos comparativos da intensidade da resposta imunoalérgica em diferentes regiões corporais dos caprinos, delimitou-se o presente estudo visando determinar a região corpórea de eleição para a realização do teste de tuberculina simples.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 caprinos adultos, clinicamente sadios e negativos ao Teste Cervical Comparativo (TCC) segundo os critérios estabelecidos por Silva et al. (9). Para tal procedimento foi administrado por via intradérmica 0,1 mL de PPD aviário (tuberculina aviária – 0,5 mg/mL) e 0,1 mL de PPD bovino (tuberculina bovina – 1,0 mg/mL) produzido pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do MAPA, Pedro Leopoldo, MG, (partida nº 001/03) na região cervical direita, após a tricotomia de duas áreas quadradas de pele a uma distância de 7cm entre os locais de aplicação. O PPD aviário foi injetado cranialmente e o bovino caudalmente (9). A mensuração da espessura da pele foi efetuada com cutímetro de mola, no momento imediatamente anterior ao da aplicação dos PPD's e às 72 horas, sendo considerados aptos para o experimento os animais negativos.

Sessenta dias após a realização do teste de tuberculinização inicial inoculou-se 0,5 mL da suspensão sensibilizante, via intramuscular, no membro posterior dos 20 animais. Para sensibilizar os animais foi utilizado inóculo inativado de *M.bovis* AN₅ (suspensão de 4mg/mL) preparado e cedido pelo LANAGRO/MG (partida nº 001/03).

Decorridos dois meses da sensibilização, os animais foram submetidos à tuberculinização. Após tricotomia, em cada região foi administrado, via intradérmica, 0,1 mL de PPD bovino no grupo experimental e nos seis animais do grupo controle administrou-se solução fisiológica. A mensuração da pele foi efetuada 24 horas antes e 0h, 24h, 48h, 72h e 96 horas após a aplicação do PPD.

As regiões anatômicas investigadas foram: cervical (cranial e caudal), torácica (dorsal e ventral), abdominal (dorsal e ventral) e prega da cauda. Com exceção da prega da cauda, as demais regiões testadas foram as do lado esquerdo do animal (Figura 1).

A análise dos resultados foi realizada segundo Zar (12), utilizando o programa ASSISTAT 7,5. O nível de significância adotado foi de 0,05. O teste de Friedman foi empregado para a avaliação das diferenças das espessuras de pele nos locais de aplicação do PPD e salina, em relação a um mesmo momento (amostras dependentes); o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliação da mesma região nos diferentes momentos (amostras independentes).

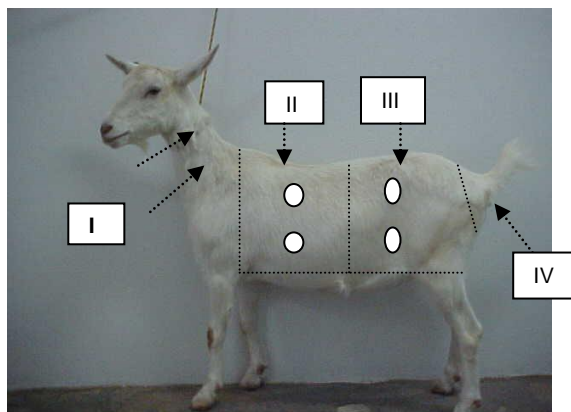


Figura 1. Regiões do animal onde foi realizada a tuberculinização: I – região cervical: cranial e caudal, II- região torácica: dorsal e ventral, III - região abdominal: dorsal e ventral e IV - prega da cauda. Os locais assinalados foram os locais de aplicação de PPD bovino, no lado esquerdo do animal.

RESULTADOS

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores das médias e desvios padrão da espessura de pele dos caprinos experimentalmente sensibilizados, em diferentes regiões corpóreas, com a cepa AN₅ de *Mycobacterium bovis*.

As espessuras de pele obtidas nas diversas regiões estudadas não apresentaram diferenças quando se comparava o mesmo animal e região, 24 horas antes da aplicação e o momento zero ($p > 0,05$).

As respostas ao PPD bovino não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre os momentos de 48h, 72h e 96 horas pós aplicação nas diferentes regiões corpóreas estudadas, com exceção da prega da cauda na qual as melhores respostas foram observadas 72h e 96 horas da aplicação do antígeno.

Foi constatada evolução crescente e progressiva nos aumentos da espessura de pele, particularmente nos animais inoculados com PPD nas regiões abdominal dorsal, torácica dorsal e cervical caudal (Fig.2)

Apesar da região da prega da cauda não propiciar os melhores resultados, ela apresentou melhor resposta que as obtidas nas regiões ventrais (torácica e abdominal).

Tabela 1. Valores (mm) das médias, desvios padrão da espessura de pele obtida com a aplicação do PPD bovino em caprinos experimentalmente sensibilizados com *M.bovis* estirpe AN₅, segundo a região corpórea e o momento da leitura. Itapetininga,SP, 2008.

Região corpórea	Momentos de leitura							
	24h (p.i)		48h (p.i)		72h (p.i)		96h (p.i)	
	Δ PPD b	Δ s.f.	Δ PPD b	Δ s.f.	Δ PPD b	Δ s.f.	Δ PPD b	Δ s.f.
Cervical cranial	1,04±1,01	0,27±0,35	1,32±0,84	0,50±0,48	1,76±0,83	0,68±0,62	1,71±0,84	0,72±0,74
Cervical caudal	0,77±0,87	0,00±0,55	1,30±0,79	0,53±0,23	1,82±0,91	0,47±0,40	1,79±1,02	0,33±0,38
Torácica dorsal	1,20±1,38	-0,32±0,44	1,83±1,37	0,28±0,21	2,01±1,36	0,58±0,38	1,83±0,80	0,43±0,10
Torácica ventral	0,51±0,94	-0,05±0,37	0,94±0,64	0,62±0,51	1,13±0,42	0,67±0,32	1,20±0,87	0,30±0,23
Abdominal dorsal	0,79±0,58	0,12±0,45	1,74±0,50	0,40±0,51	2,16±0,67	0,75±0,49	1,96±0,75	0,35±0,42
Abdominal ventral	0,31±0,47	0,25±0,26	0,91±0,56	0,40±0,32	1,17±0,53	0,78±0,39	1,26±0,66	0,38±0,30
Prega da cauda	0,24±0,49	-0,35±0,27	0,99±0,43	0,33±0,50	1,38±0,52	0,32±0,44	1,58±0,58	0,68±0,88

Nota: p.i. = pós injeção h = horas

Δ PPD b = diferença da espessura de pele após e antes da aplicação da tuberculina

Δ s.f. = diferença da espessura de pele após e antes da aplicação de solução fisiológica

Tabela 2. Médias (mm) das diferenças das mensurações das peles de caprinos experimentalmente sensibilizados com *M. bovis* estirpe AN5 e tuberculinizados com PPD bovino, segundo o momento da leitura e a região do corpo na qual o teste foi realizado. Itapetininga,SP, 2008.

Momentos	Cervical		Torácica		Abdominal		Prega da cauda
	Cranial	Caudal	Dorsal	Ventral	Dorsal	Ventral	
48 horas	1,32 ^A _{abcd}	1,30 ^A _{bcd}	1,83 ^A _{ab}	0,94 ^A _{bcd}	1,74 ^A _a	0,91 ^A _d	1,01 ^A _{cd}
72 horas	1,76 ^A _{abc}	1,82 ^B _{abc}	2,01 ^A _{bcd}	1,13 ^A _e	2,16 ^B _a	1,17 ^A _{de}	1,39 ^B _{cde}
96 horas	1,71 ^A _{ab}	1,79 ^B _a	1,83 ^A _{ab}	1,20 ^A _{bc}	1,96 ^{AB} _a	1,26 ^A _{bc}	1,58 ^{AB} _{abc}

Nota: Valores médios com letras maiúsculas divergentes, nas mesmas colunas, indicam diferença estatística significativa entre momentos dentro de cada local ($p < 0,05$); valores médios com letras minúsculas divergentes, nas mesmas linhas, indicam diferença estatística significativa entre locais em dentro de cada momento ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Foram observadas reações intradérmicas em todos os animais sensibilizados com PPD bovino. No entanto ocorreram variações na cutimetria conforme as regiões corpóreas utilizadas. Estudo similar, conduzido em ovinos (13), destacou as áreas corpóreas mais sensíveis à tuberculinização indicando como melhor local de aplicação a região torácica dorsal, seguida da cervical média e abdominal dorsal. Estas regiões também foram as melhores no presente estudo, mudando apenas a ordem para abdominal dorsal, torácica dorsal e cervical caudal. Estas variações não são conflitantes já que, nos dois trabalhos, não se observa diferenças estatisticamente significantes entre estas regiões corpóreas.

Corrêa JGZ. et al. Influência da região corpórea no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose caprina. Vet. e Zootec. 2011 dez.; 18(4): 680-687.

Justificados pela ausência de padronização de condutas de aplicação da tuberculina em caprinos e ovinos, pesquisadores (9,14-16) adotaram a região cervical para a aplicação do PPD em pequenos ruminantes. Considerando-se as condições que facilitam a aplicação da tuberculina, as regiões cervical, abdominal e da prega da cauda são mais apropriadas; a região torácica, embora de fácil acesso, apresenta dificuldades na aplicação quando o animal não é contido adequadamente devido ao tensionamento da pele (13). A região da prega da cauda é uma região que deve ser utilizada com ressalvas, embora tenha apresentado melhor resposta à tuberculina do que as regiões ventrais (torácica e abdominal). A leitura da reação realizada neste local pode sofrer interferências relacionadas ao modo de realização da prova, sujidades locais e possível presença de ectoparasitas.

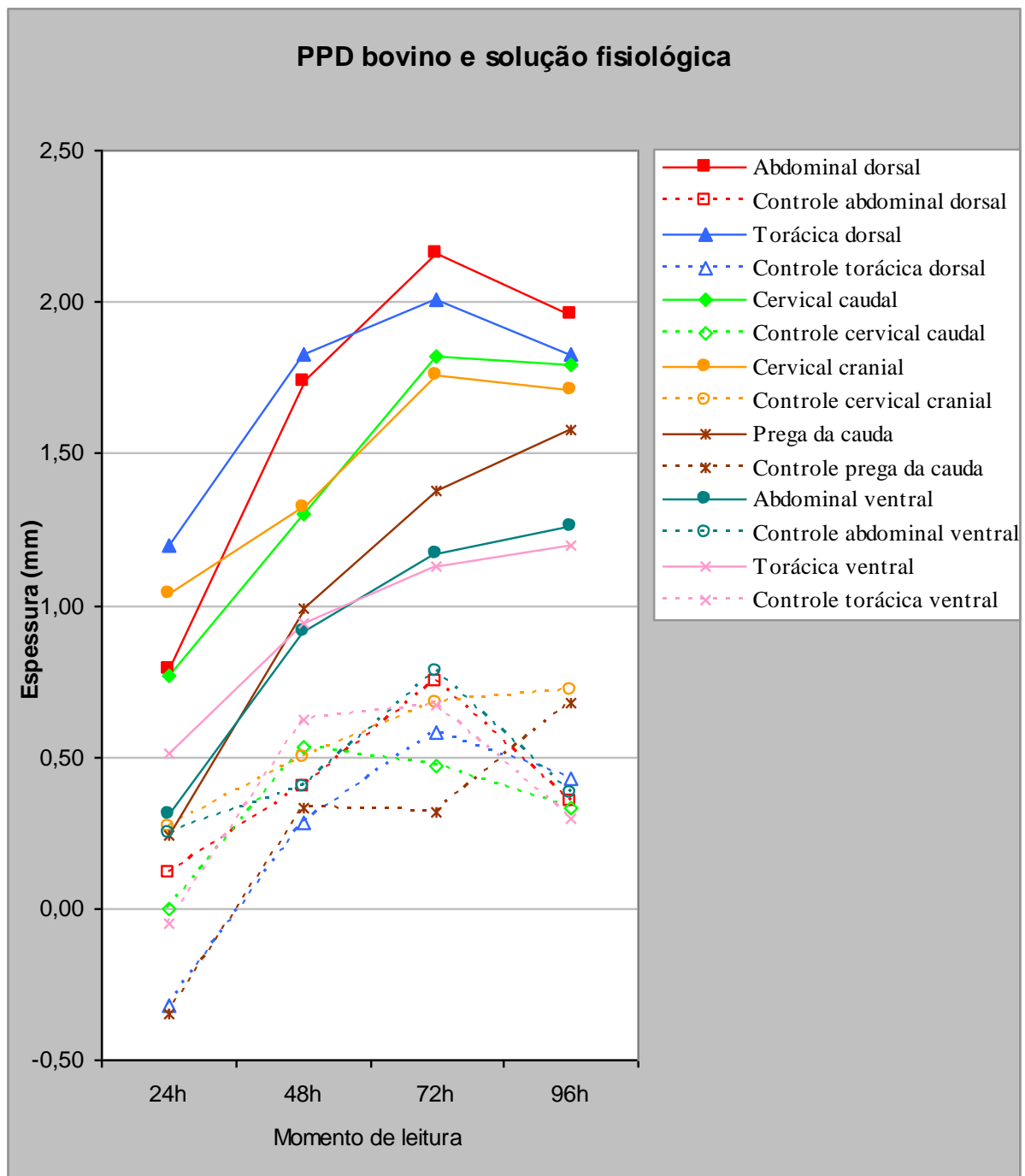


Figura 2. Valores (mm) médios das diferenças das espessuras de pele de caprinos experimentalmente sensibilizados com *M. bovis* estirpe AN₅, conforme a região corpórea e o momento de leitura. Itapetininga, SP, 2008.

Silva et al. (9) e Cyrillo et al. (14) investigando o diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos e ovinos, respectivamente, constataram que a partir de 12 horas de aplicação da tuberculina, já há uma considerável reação cutânea. Em contraste, no presente trabalho, as mensurações foram efetuadas com intervalos de 24 horas. O ponto médio máximo da reação tuberculínica nos animais estudados foi atingido às 48 horas após a aplicação. Porém, em certas regiões, a reação máxima foi observada após 72 horas. Este perfil reacional concorda com Tizard (17), que referiu a possibilidade da resposta inflamatória na reação tuberculínica em animais atingir a maior intensidade entre 24 a 72 horas da aplicação do antígeno.

Yuri (13) constatou que na prova de tuberculina, em ovinos, os melhores momentos de leitura ($p < 0,01$) para todas as regiões estudadas (cervical, torácica, abdominal, prega da cauda e face interna da coxa) ocorreram entre 48h e 72 horas. No presente estudo, as respostas ao PPD bovino não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre os momentos de 48h, 72h e 96 horas pós aplicação nas diferentes regiões corpóreas estudadas, com exceção da prega da cauda na qual as melhores respostas foram observadas 72h e 96 horas da aplicação do antígeno.

Embora não tenha sido constatada diferença estatística entre os resultados obtidos às 48, 72 e 96 horas, recomenda-se a leitura da reação tuberculínica às 72 horas da aplicação do PPD como tempo padrão para leitura final, à semelhança de bovinos e bubalinos, em virtude da prova fundamentar-se em reação de hipersensibilidade do tipo IV, com manifestação tardia (17).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que as melhores regiões para a utilização do teste de tuberculinização simples são a abdominal dorsal, torácica dorsal e cervical caudal.

AGRADECIMENTOS

Aos médicos veterinários Dr. Carlos Frederico de Carvalho Rodrigues e Dr. Frederico Fontoura Leinz, pesquisadores da Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios (APTA) de Itapetininga (SP), pela concessão do local e dos animais para o experimento.

Aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ/USP em 23/04/2007 (protocolo n° 1.100/2007)

REFERÊNCIAS

1. Thoen CO. Tuberculosis. J Am Vet Med Assoc. 1988;193:1045-8.
2. Bernabé A, Gómez MA, Navarro JA, Gómez S, Sánchez J, Sidrach J, et al. Morphopathology of caprine tuberculosis. An Vet Murcia. 1991;6/7:9-29.
3. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections. Vet Microbiol. 1994;40:153-77.

4. Lesslie IW, Ford EJH, Linzell JL. Tuberculosis in goats caused by the avian type tubercle bacillus. *Vet Rec.* 1960;72:25-7.
5. Cousins DV, Francis BR, Casey R, Mayberry C. Mycobacterium bovis infection in a goat. *Aust Vet J.* 1993;70:262-3.
6. Griffith AS. Tuberculosis of the domesticated species of animals. *J Comp Pathol.* 1928;41:109-27.
7. Seva J, Menchén V, Navarro JA, Pallarés FJ, Villar D, Vásquez F, et al. Caprine tuberculosis eradication program: An immunohistochemical study. *Small Rumin Res.* 2002;46:107-14.
8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - Manual técnico. Brasília: MAPA/SDA/DAS; 2006.
9. Silva PEG, Pinheiro SR, Leal MLR, Bertagnon HG, Mota PMPC, Senhorini IL, et al. Teste de tuberculinização em caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados. *Cienc Rural.* 2006;36:880-6.
10. Roxo E, Vasconcellos SA, Pinheiro SR, Baruselli PS, Macruz R, Leite CQF. Evaluation of tuberculin skin reaction in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Arq Inst Biol.* 1998;65:81-92.
11. Thorel MF, Gaumont R. Contribution à l'étude des réactions sérologiques et allergiques chez la chèvre sensibilisée par des antigènes tuberculeux. *Bull Acad Vet Fr.* 1977;50:549-68.
12. Zar JH. Bioestatistical analysis. 2ª ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall; 1984.
13. Yuri DMRS. Estudo da resposta alérgica à tuberculina em ovinos (*Ovis aries*) experimentalmente sensibilizados, conforme a região corpórea e a dose de PPD utilizada [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2010.
14. Cyrillo FC, Leal MLR, Mota PMPC, Senhorini IL, Vasconcellos AS, Pinheiro SR, et al. Teste de tuberculinização em ovinos (*Ovis aries*) experimentalmente sensibilizados. *Arq Inst Biol.* 2007;74:191-7.
15. Marcondes AG. Micobacterioses de ovinos (*Ovis aries*) do Estado de São Paulo, Brasil. Correlação entre teste imunoalérgico, cultivo e histopatológico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2007.
16. Benesi FJ, Pinheiro SR, Maiorka PC, Sakamoto SM, Roxo E, Benites NR, et al. Relato de caso: tuberculose em caprino (*Capra hircus*). *Arq Inst Biol.* 2008;75:217-20.
17. Tizard IR. Veterinary immunology. 6ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000.

Recebido em: 25/04/11

Aceito em: 01/11/11