

COMPARAÇÃO DE TRÊS TESTES DE TUBERCULINA USADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BÚFALOS DE ÁGUA NA ILHA DE MARAJÓ

Alexandre do Rosário Casseb¹
Andréa Góes Negrão¹
Livia Medeiros Neves Casseb²
Sandro Patroca Silva¹
Érika Dayane Leal Rodrigues³
Wilton Figueiredo Lima⁴
Hélio Langoni⁵

RESUMO

O Estado do Pará corresponde a 26 % da região Amazônia brasileira e estima-se que o rebanho de búfalos represente em torno de 45% da população de búfalos do Brasil, principalmente, localizados na ilha de Marajó. Este trabalho teve como objetivo comparar três diferentes tipos de testes tuberculínicos utilizados para o diagnóstico da tuberculose em búfalos de água (*Bubalus bubalis*) e os resultados comparados com animais com e sem tuberculose. Os resultados deste trabalho permitiram fazer as seguintes conclusões: o teste cervical simples em búfalos não é recomendável devido à baixa especificidade, produzindo uma grande margem de erros (sacrifício de animais falsos positivos); a prova intradérmica dupla tem baixa especificidade e com o inconveniente de aplicar duas vezes tuberculina, sendo assim há necessidade de três visitas a fazenda, elevando o custo e manejo; o teste cervical comparativo é o melhor método, pois possui alta especificidade e sensibilidade, pois as reações à tuberculina em búfalos se caracterizam por elevado número de reações inespecíficas devido ao seu hábito aquático.

Palavras-chave: tuberculose, *Bubalus bubalis*, teste de tuberculina.

COMPARISON OF THREE TUBERCULIN SKIN TESTS USED TO DIAGNOSE TUBERCULOSIS IN WATER BUFFALOES IN MARAJÓ ISLAND

ABSTRACT

The state of Pará corresponds to 26% of the Brazilian Amazon Region and contains a herd of buffaloes that represent around 45% of the buffalo population in Brazil. This herd is located especially in the Marajó Island. The aim of this study was to compare three different types of tuberculin skin tests used for the diagnosis of tuberculosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) and compare the results with infected and uninfected animals by tuberculosis. The results of this study allows to the following conclusions: The single cervical test in buffaloes is not recommended due to the low specificity, producing a large margin of error (sacrifice of false positive animals); the double intradermal tuberculin test has a low specificity and the inconvenience of applying twice tuberculin, therefore is necessary three visits in the farm, raising the costs. The comparative cervical testis is the best method, because it has high

¹ Professor(a) da Universidade Federal Rural da Amazônia. Contato principal para correspondência.

² Doutorando em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazônia.

³ Residente em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal Rural da Amazônia.

⁴ Graduanda em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural da Amazônia.

⁵ Professor(a) Titular do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ-UNESP, Botucatu – SP.

specificity and sensitivity, and the reactions of tuberculin in buffaloes are characterized by a high number of nonspecific reactions, due mainly to the buffalo aquatic habit.

Keywords: tuberculosis, *Bubalus bubalis*, tuberculin skin test.

COMPARACIÓN DE TRES PRUEBAS DE TUBERCULINA UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EN BÚFALOS DE AGUA DE LA ISLA DE MARAJÓ

RESUMEN

El estado de Pará corresponde con el 26% en la región Amazonica brasileña y se estima que la manada de búfalos representa al rededor del 45% de la población de búfalos de Brasil, principalmente ubicados en la isla de Marajó. Este estudio tuvo como objetivo comparar tres tipos distintos de pruebas de tuberculina utilizadas para el diagnóstico de la tuberculosis en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y los resultados en comparación con los animales con y sin tuberculosis. Los resultados de este estudio proporcionan las siguientes conclusiones: la prueba cervical en los búfalos no se recomienda debido a la baja especificidad, la producción de un gran margen de error (sacrificio de los animales falsos positivos), la prueba intradérmica doble tiene una baja especificidad y la inconveniencia de aplicar dos veces la tuberculina, lo que no necesita de tres visitas al campo, elevando el costo y la gestión, la prueba cervical comparativa es el mejor método, ya que tiene una alta especificidad y sensibilidad, como las reacciones a la tuberculina en los búfalos se caracterizan por un alto número de reacciones inespecíficas debido a su hábito acuático.

Palabras clave: tuberculosis, *Bubalus bubalis*, pruebas de tuberculina.

INTRODUÇÃO

O Estado do Pará corresponde a 26 % da região Amazônia brasileira e estima-se que o rebanho de búfalos represente em torno de 45% da população de búfalos do Brasil, principalmente, localizados na ilha de Marajó (1). A tuberculose em búfalos é uma enfermidade infectocontagiosa de caráter crônico, caracterizada pela formação de granulomas específicos, denominados tubérculos e seu principal agente etiológico é o *Mycobacterium bovis* (2).

As tuberculinas são extratos de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* ou *Mycobacterium avium*, que são utilizados em testes cutâneos para o diagnóstico de tuberculose, empregando-se vários tipos, porém, hoje o mais utilizado é o derivado proteico puro de tuberculina (PPD) (3).

São utilizados vários métodos de reação de provas intradérmicas para o diagnóstico da tuberculose usando extratos de *Mycobacterium* spp. em cultivo como o PPD, sendo hoje os métodos mais utilizados o teste cervical simples (TCS) e o teste cervical comparativo (TCC) (4). Entretanto Corrêa & Corrêa (5) relatam a importância do uso da prova intradérmica dupla (PID) em bovinos, destacando que a mesma quando bem empregada é mais específica que as demais provas.

Entre os animais que sofrem de tuberculose, o búfalo é bastante comum, principalmente no gado leiteiro (6), sendo os testes tuberculínicos muito utilizados em bovinos. Em bubalinos, pouco estudo tem estado disponível sobre o assunto (7). Por isso, este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de três diferentes tipos de testes tuberculínicos utilizando o TCS, TCC e a PID comparando os resultados com animais com e sem tuberculose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 24 búfalos de água (*Bubalus bubalis*), fêmeas, com idade superior a 24 meses e pertencentes a uma fazenda localizada no município de Salvaterra, na Ilha de Marajó, Estado do Pará, Brasil (00°45'10"S 48°31'01"). O TCS e TCC foram realizados como recomendado por Brasil (4) e a PID foi realizada conforme recomendado por Corrêa & Corrêa (5).

No local da criação, após o abate e necropsia de todos os 24 animais estudados, foram examinados seis pares de linfonodos entre os de cabeça (mandibulares, parotídeos e retrofaríngeos), torácicos (mediastínicos e bronquiais), mesentéricos e da carcaça (pré-escapulares, ilíacos, isquiáticos, sacral e inguinal superficial), além de órgãos como pulmão, fígado, baço, rim, úbere e órgãos genitais.

Para confirmação dos resultados da necropsia, foram coletados materiais para a realização do exame direto por impressão ou esfregaço corado pelo método de Ziehl-Neelsen (5). Após serem triturados em gral estéril, eram feitos esfregaços em duas lâminas que a seguir eram fixadas ao fogo e coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, para observação em microscópio no aumento de 1000 vezes e constatação da existência de bacilos álcool-ácido resistentes.

Para os materiais que foram negativos para bacilos álcool-ácido resistentes no exame direto o triturado era suspenso em partes iguais em ácido sulfúrico a 8% e, após mistura, colocado em estufa a 37° C durante 20 minutos, e em seguida neutralizando com hidróxido de sódio a 8%. Foi então colocado em tubos estéreis e submetidos a 3000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, suspenso em líquido residual. Foram preparadas duas lâminas e coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e examinadas a microscopia em aumento de 1000 vezes.

Os resultados dos testes de tuberculina positivos e negativos foram comparados aos achados *post mortem* e exame microscópico pela distribuição de probabilidade condicional, usando o teste *screening* para estabelecer a sensibilidade, especificidade, falso-positivos, falso-negativos, valor preditivo do teste positivo, valor preditivo do teste negativo e acurácia. Os testes de tuberculina que resultaram inconclusivos foram retirados deste cálculo. Os parâmetros foram calculados usando o programa BioEstat 5.3 (8).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A necropsia de 18 animais apresentou lesões compatíveis (granulomas) com o quadro de tuberculose e todos mostraram exame microscópico positivo (presença de bacilos álcool-ácido resistentes) sendo considerados animais com tuberculose. Apenas seis animais não apresentaram lesões, que foram considerados como animais sem tuberculose. As tabelas 1 e 2 demonstram os resultados dos diferentes testes realizados em animais com tuberculose e sem tuberculose, respectivamente.

Os resultados do teste de *screening* estão na tabela 3 e demonstram que nos búfalos estudados o TCS apresenta alta sensibilidade, porém, baixa especificidade, produzindo grande quantidade de animais falso-positivos, fato que está de acordo com os resultados obtidos por Kanameda et al. (9), fator preocupante para o teste, pois a eliminação de animais sadios causa grave problema na economia da propriedade, assim como, a credibilidade do teste utilizado, portanto o TCS não deve ser utilizado em criações bubalinas com os parâmetros de corte, hoje utilizados no Brasil, que são de 4 mm. Roxo et al. (7), Mota et al. (10) e Lopes et al. (11), também, referem a necessidade de mudança no critério de interpretação para esse teste, que é amplamente utilizado em bovinos, mas que não produzem bons resultados em búfalos.

Tabela 1. Resultado de três diferentes testes de tuberculina em búfalos com tuberculose

Resultado	TCS		TCC		PID	
	N	%	N	%	N	%
Positivo	18	100	14	77.78	13	72.22
Negativo	00	00	00	00	05	27.78
Inconclusivo	00	00	04	22.22	00	00

Legendas: N= número de animais, %- percentual, TCS- teste cervical simples, TCC- teste cervical comparativo, PID-prova intradérmica dupla

Tabela 2. Resultado de três diferentes testes de tuberculina em búfalos sem tuberculose

Resultado	TCS		TCC		PID	
	N	%	N	%	N	%
Positivo	04	66.66	00	00	2	33.33
Negativo	01	16.66	02	33.33	3	50.00
Inconclusivo	01	16.66	04	66.66	1	16.66

Legendas: N= número de animais, %- percentual, TCS- teste cervical simples, TCC-teste cervical comparativo, PID-prova intradérmica dupla

Tabela 3. Resultados do Teste de *Screening* para três diferentes testes de tuberculina em búfalos

Parâmetros	TCS	TCC	PID
Sensibilidade	100.00%	100.00%	72.22%
Especificidade	20.00%	100.00%	60.00%
Falso-Positivos	80.00%	0.00%	40.00%
Falso-Negativos	0.00%	0.00%	27.78%
VPTP	81.82%	100.00%	86.67%
VPTN	100.00%	100.00%	37.50%
Acurácia	82.61%	100.00%	69.57%

Legendas: TCS- teste cervical simples, TCC-teste cervical comparativo, PID-prova intradérmica dupla, VPTP-valor preditivo do teste positivo, VPTN-valor preditivo do teste negativo.

Para Langenegger et al. (12), as reações cruzadas ocasionadas pela sensibilização do organismo por várias micobactérias e em distintas situações se tornam um problema que dificulta a interpretação do diagnóstico alérgico da tuberculose, tanto no homem como nos animais. Essa questão, provavelmente, se deve ao hábito aquático dos búfalos, pois esses animais têm maior contato com micro-organismos saprófitos de estrutura semelhante ao *Mycobacterium bovis*, sendo então mais propensos a reações falso positivas que os bovinos (13,14). Segundo Monaghan et al. (15), uma das mais potentes fontes de micobactérias saprófitas é a água estagnada e isto deve merecer atenção quando ocorrem reagentes inespecíficos. A especificidade também pode ser afetada pela tuberculina, o tipo de teste utilizado e pelos critérios de interpretação (16).

Por outro lado, o TCC mostrou alta sensibilidade e especificidade, quando se considerou apenas animais positivos e negativos, porém, 50% dos animais inconclusivos apresentaram quadro de tuberculose e 50% não apresentaram a doença. Portanto, os animais inconclusivos nesse teste devem permanecer isolados do rebanho para realização de outros métodos diagnósticos ou abatidos.

O TCC pode ser utilizado para diferenciar os animais infectados pelo *Mycobacterium bovis* daqueles expostos a outras micobactérias ou gêneros afins (17). Segundo Von Reyn et al.(18), o TCC pode, também, ser utilizado em pacientes humanos que sofrem de infecção

pulmonar por *Mycobacterium avium* ou *Mycobacterium tuberculosis* sendo esta técnica bastante específica (97%) em discriminar infecções causadas por esses agentes em infecções pulmonares do homem.

É interessante notar que alta sensibilidade e especificidade do TCC neste trabalho corroboram com o critério de interpretação do teste para bovinos e búfalos utilizados no Brasil (4), portanto, não há recomendação da mudança desses parâmetros como recomendado por alguns autores (7,11), pois o aumento do critério de interpretação do TCC poderá produzir maior número de animais falsos negativos, comprometendo o controle da enfermidade.

No presente estudo, alguns animais apresentaram grandes reações que dificultaram a leitura realizada pelo cutímetro (Figura 1), fato esse já observado por Roxo et al.(7), Awad e Mahamoud (19) e Shukla e Singh (20) e que chamaram atenção para as reações a tuberculina serem maiores em búfalos que em bovinos.



Figura 1. Reação tuberculínica em búfalo após 72 horas de inoculação de PPD aviário e bovino (reação maior) no Teste Cervical Comparativo.

Por outro lado, muitos animais apresentaram pequenas reações que foram positivas (>4mm) e em muitos animais negativos no TCC foi detectada reação à tuberculina aviária superior à tuberculina bovina, demonstrando o grande número de reações inespecíficas nessa espécie, provavelmente por micobactérias saprofitas que são mais comuns nessa espécie em relação aos bovinos (9).

A PID utilizada nesse trabalho teve sensibilidade de aproximadamente 72% e especificidade de 60%, portanto, um teste em que, apesar da baixa especificidade, mostrou melhores resultados que o TCS em detectar os animais falsos positivos, mas apresentou resultados falsos negativos de aproximadamente 28%, podendo deixar muitos animais com tuberculose no rebanho. Outro fator importante é que para realizar a PID são necessárias três visitas à propriedade encarecendo e tornando esse teste mais laborioso. Por esses fatores, não recomendamos a utilização do referido teste em búfalos.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem fazer as seguintes conclusões: o TCS em búfalos não é recomendável devido à baixa especificidade, produzindo uma grande margem de erros (sacrifício de animais falsos positivos); a PID tem baixa especificidade e com o inconveniente de aplicar duas vezes tuberculina, sendo assim há necessidade de três visitas a fazenda, elevando o custo e manejo; TCC é o melhor método, pois possui alta especificidade e sensibilidade, pois as reações à tuberculina em búfalos se caracterizam por elevado número de reações inespecíficas devidas, principalmente, ao seu hábito aquático.

REFERÊNCIAS

1. Barbosa NGS. Bubalinocultura no Estado do Pará. Rev Bras Reprod Anim [Internet]. 2005 [cited 2013 Set 21];29:34-8. Available from: <<http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RE0193438.pdf>>.
2. Oliveira IAS, Melo HPC, Câmara A, Dias RVC, Soto-Blanco B. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. Braz J Vet Res Anim Sci. 2007;44:395-400.
3. Pollock JM, Mcnair J, Bassett H, Cassidy E, Costello H, Aggerbeck I, et al. Specific Delayed-Type Hypersensitivity Responses to ESAT-6 Identify Tuberculosis-Infected Cattle. J Clin Microbiol. 2003;41:1856-60. Doi: 10.1128/JCM.41.5.1856-1860.2003.
4. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal-PNCEBT. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2006. p.60-4.
5. Corrêa WM, Corrêa CNM. Tuberculose. In: *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2a ed. Rio de Janeiro: Medsi; 1992. p.317-45.
6. Láu HD. *Doenças em búfalos no Brasil: diagnóstico, epidemiologia e controle*. Belém: Embrapa-CPATU; 1999.
7. Roxo E, Vasconcellos AS, Pinheiro SR, Baruselli PS, Macruz R, Leite CQL. Evaluation of tuberculin skin reaction in buffaloes (*Bubalus bubalis*). Arq Inst Biol São Paulo. 1998;65:81-92.
8. Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: sociedade civil mairauá; 2007.
9. Kanameda MM, Ekgatit S, Wongkasemjit C, Sirivan T. An evaluation of tuberculin skin tests used to diagnose tuberculosis in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). Prev Vet Med. 1999;39:129-35.
10. Mota PMPC, Lobato FCF, Assis RA, Lage AP, Parreiras PM, Leite RC. Ocorrência de tuberculose em rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*-Linneus, 1758) no Município de Parintins, Amazonas. Arq Bras Med Vet Zootec. 2002;54: 441-3.
11. Lopes LB, Cunha AP, Mota RA, Leite RC. Comparação de duas técnicas de tuberculinização em búfalos. Cienc Anim Bras. 2006;7:187-91.

12. Langenegger JC, Langenegger H, Mota PMPC, Leite RC. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. *Pesq Vet Bras.* 1981;1:145-9.
13. Pinto MRM, Wanasinghe DD, Ravindran KV. Studies in tuberculin sensitivity of livestock in Ceylon. II. Patterns of sensitivity in the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Ceylon Vet J.* 1973;21:10-5.
14. Hein WR, Tomasovic AA. An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. *Aust Vet J.* 1981;57:543-7.
15. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Quinn PJ. The tuberculin test. *Vet Microbiol.* 1994;40:111-24.
16. O'reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.* 1995;76:1-46.
17. Haagsma J. Bovine tuberculosis. In: *OIE Manual (Amendment2)*. Paris: OIE; 1995. p.11.
18. Von Reyn CF, Williams DE, Horsburgh CR, Jaeger AS, Marsh BJ, Haslov K, et al. Dual skin testing with *Mycobacterium avium* sensitin and purified protein derivative to discriminate pulmonary disease due to *M. avium* complex from pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1998;177:730-6.
19. Awad FI, Mahamoud AH. The single intradermal comparative tuberculin test in the egyptian buffalo. *Vet Rec.* 1957;16:133.
20. Shukla RR, Singh G. Studies on tuberculosis among Indian buffaloes. *Indian Vet J.* 1972;49:119-23.

Recebido em: 28/01/2014

Aceito em: 22/10/2014