

## ESTUDOS SÔBRE A PARATUBERCULOSE

### III. ISOLAMENTO DO *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* EM EMBRIÃO DE GALINHA \*

NORMA MORAES DA SILVA \*\*

#### I. INTRODUÇÃO

Os trabalhos experimentais sôbre Paratuberculose, no sentido de se encontrar um animal de laboratório sensível à inoculação do *Mycobacterium paratuberculosis*, têm sido realizados desde longa data e por diversos autores.

Inoculações do *Mycobacterium paratuberculosis* em animais de laboratório têm sido realizadas com mais freqüência em coelhos<sup>2, 6, 14</sup> e em hamster<sup>6</sup> mas com pouco sucesso. Rankin<sup>11</sup> entretanto relata que coelhos inoculados intravenosamente com 2 semanas de idade, desenvolveram lesões típicas e sintomas da doença.

Francis<sup>5</sup> conseguiu produzir uma infecção progressiva em camundongos com 14 dias de idade, a qual se iniciou no fígado e baço e eventualmente envolveu também o trato intestinal. Lominsky, Cameron e Roberts<sup>5</sup>, encontraram que camundongos inoculados por via intravenosa ou intraperitoneal excretaram o bacilo nas fezes por 8 a 16 meses e que as lesões contendo os bacilos estavam presentes nos intestinos, gânglios linfáticos mesentéricos, fígado e baço.

As inoculações em ovos de galinha embrionados têm sido entretanto raras. Stavitsky<sup>13</sup>, em 1946, inoculou quatro amostras padrões de *Mycobacterium paratuberculosis* em ovos de galinha embrionados. O referido autor usou para a realização dêste trabalho ovos de galinha embrionados com 11 dias de incubação e as inoculações foram feitas por diversas vias. Das amostras inoculadas apenas uma, "Strain M", apresentou crescimento, produzindo lesões na membrana cório-alantoide, quando inoculada por esta via.

No presente trabalho conseguimos o isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* em ovos de galinha embrionados diretamente de fragmentos de gânglios mesentéricos de um bovino com Paratuberculose<sup>12</sup>.

#### II. MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* em ovos de galinha embrionados, realizamos inoculações de suspensões de gânglios mesentéricos triturados provenientes de um bovino no qual diagnosticamos a Paratuberculose<sup>12</sup>.

*Preparo da suspensão:* — a suspensão usada como inoculum foi preparada a partir de gânglios linfáticos mesentéricos e obtida da seguinte maneira: após

\* Entregue para publicação em 28-8-61.

Trabalho a ser apresentado no VIIIº Congresso Brasileiro de Veterinária, a realizar-se em Belo Horizonte.

\*\* Veterinária da Seção de Zoonoses Bacterianas do Instituto de Biologia Animal do Ministério da Agricultura.

flambagem da superfície dos gânglios com uma espátula de metal fortemente aquecida na chama de um bico de Bunsen, retirou-se fragmentos de cerca de 1 cm<sup>2</sup>.

Estes fragmentos, empregando-se o maior rigor de assepsia, foram triturados em gral, adicionando-se em seguida 30 ml de sôro fisiológico a 8,5 por mil. O volume da suspensão obtida foi medido e dividido em duas partes, A e B.

*Suspensão A, com vitamina K:* à parte A da suspensão obtida foi acrescentada, em substituição ao "fator essencial de crescimento", a vitamina K (7, 15), contida em um produto comercial, cuja fórmula é a seguinte

Vitamina K hidrossolúvel .....	0,015 g
Gelatina puríssima .....	2,0 g
Água destilada q.s.p. ....	20 ml

Para cada ml da suspensão A adicionou-se 0,1 ml deste produto comercial.

*Suspensão B, sem vitamina K:* a parte B da suspensão de gânglios mesentéricos foi utilizada sem adição de quaisquer substâncias.

*Inoculação em ovos embrionados:* para as inoculações foram utilizados ovos de casca branca, provenientes de granja oficial, a qual faz periodicamente o controle da Pulorose.

Usamos para a inoculação de cada suspensão 22 embriões, sendo 11 com 4 dias e os restantes com 11 dias de incubação. Foram utilizados como testemunhas 6 embriões para cada suspensão, os quais não foram inoculados.

Estes ovos eram incubados em chocadeira elétrica, regulada a 37°C e com uma umidade de 60 a 65°, sendo examinados ao ovoscópio antes da inoculação para marcação da câmara de ar e do embrião, e colocado em recipientes especiais com a câmara de ar para cima.

Para efetuar a inoculação conforme Camargo<sup>3</sup>, se desinfetava o vértice da câmara de ar com tintura de iodo diluída a 1% e neste local se fazia uma perfuração com um aparelho especial (Dremel-moto tool) de 1 a 2 mm de diâmetro, para permitir a passagem da agulha. Para a inoculação utilizamos agulhas 40 x 5, que eram introduzidas através da câmara de ar dirigindo-se-a para o lado oposto onde se encontra o embrião, de maneira que o inoculum, cuja quantidade era de 0,2 ml, ficasse depositado no saco vitelino. Feitas as inoculações as perfurações eram fechadas com uma mistura em partes iguais, de parafina e cera de abelhas.

Os ovos inoculados eram novamente levados à incubadeira onde permaneciam, sendo feito diariamente o controle da viabilidade dos embriões, com o auxílio do ovoscópio. Havendo embriões mortos os ovos eram abertos, com todos os cuidados de assepsia, através da câmara de ar, cortando-se a casca e deixando-se descoberta a membrana da casca que era separada com ajuda de pinças junto com a âmnio-alantoidiana, ficando desta forma descoberto o embrião, o qual era colocado em uma placa de Petri estéril. O controle da presença do *Mycobacterium paratuberculosis* era feito por meio de esfregaços da gema, corados pelo método de Ziehl-Neelsen<sup>1</sup>.

As inoculações subseqüentes ao isolamento foram realizadas em embriões com 4 e 7 dias de incubação, com uma suspensão da gema em salina estéril, correspondente ao tubo n.º 3 da escala de Mc Farland, usando-se sempre a mesma via de inoculação, e deixando-se um número de testemunhas igual ao de ovos inoculados.

*Cultura em meios artificiais:* as culturas do *Mycobacterium paratuberculosis* foram feitas em meio de Hohn com glicerina, a partir da gema, fígado, baço e encéfalo dos embriões.

## III. RESULTADOS

Os resultados obtidos das inoculações em ovos embrionados podem ser sumarizados da seguinte forma.

*Suspensão A, com vitamina K:* nos 5 primeiros dias após a inoculação morreram dos 44 ovos inoculados, 18 embriões que se revelaram negativos ao exame bacterioscópico da gema e do embrião. Decorridos 10 dias da inoculação morreu mais um embrião que revelou ao exame microscópico de esfregaços da gema, corados pelo método de Ziehl-Neelsen, a presença de alguns bacilos álcool-ácido resistentes. Quatro dias depois, isto é, com 14 dias de inoculado morreu mais um embrião no qual constatamos grande riqueza do *Mycobacterium paratuberculosis* nos esfregaços da gema e também nos de fígado, baço e encéfalo. Os dois embriões restantes foram sacrificados e revelaram-se positivos ao exame bacterioscópico. Todos os embriões positivos faziam parte do grupo inoculado com 4 dias de incubação.

*Suspensão B, sem vitamina K:* dos 22 ovos embrionados inoculados com a suspensão B, 13 morreram e os outros foram sacrificados, efetuando-se em todos o contrôlo bacterioscópico por meio de esfregaços da gema e embrião corados pelo método de Ziehl-Neelsen, revelando a totalidade resultado negativo.

Nos embriões inoculados não se notam lesões macroscópicas, chegando os ovos muitas vezes à eclosão. Estes pintos que nasceram dos ovos inoculados, foram sacrificados com 1, 2, até 10 dias de idade, verificando-se que são positivos apenas até a gema ser totalmente reabsorvida. Após o desaparecimento da gema não encontramos mais nenhum bacilo álcool-ácido resistente.

Sob o ponto de vista da morfologia do *Mycobacterium paratuberculosis* notamos ao exame dos esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen que os bacilos apresentavam-se mais granulados do que quando cultivados em meios artificiais, e parece-nos também um pouco mais grossos.

*Cultura em meios artificiais:* — Os tubos de meio de Hohn com glicerina<sup>1</sup>, semeados com a gema e órgãos dos embriões positivos, apresentaram após 6 dias em estufa a 37°C, crescimento abundante, sem colônias isoladas, de um induto com pigmento da cor da gema do ovo. O exame de esfregaços das culturas obtidas, corados pelo método de Ziehl-Neelsen, revelou tratar-se de crescimento puro de *Mycobacterium paratuberculosis*. Esta pigmentação é até o momento persistente nas repicagens sucessivas em meio de Hohn com glicerina.

## IV. COMENTÁRIOS

Baseados nos trabalhos de Wooley e Mc Carter<sup>15</sup>, e de Kujungiev<sup>7</sup> que já haviam usado com sucesso a vitamina K em substituição ao extrato de *Mycobacterium phlei*, nos meios de cultura para o *Mycobacterium paratuberculosis*, adicionamos a referida vitamina à uma das suspensões a ser inoculada. Este artifício de técnica proporcionou resultados satisfatórios, pois, como se pode verificar no item de RESULTADOS, só conseguimos isolar o *Mycobacterium paratuberculosis* dos embriões inoculados com a suspensão de gânglios adicionada de vitamina K. As inoculações subsequentes foram entretanto realizadas com suspensão da gema em salina estéril, sem a adição de quaisquer substâncias, obtendo-se crescimento abundante.

Escolhemos o saco da gema como via de inoculação em face de ser nossa intenção neste trabalho, isolar o *Mycobacterium paratuberculosis* mais rapidamente do que em meios de cultura artificiais, facilitando assim o diagnóstico. Como sabemos ser a gema rica em substâncias nutritivas<sup>10</sup>, e usada na

elaboração da maioria dos meios de cultura para o gênero *Mycobacterium*, foi esta via por nós preferida.

A granulação dos bacilos, assim como a pigmentação das culturas, verificadas nesta amostra isolada em ovos embrionados, já havíamos anteriormente obtido, embora mais discretamente no tocante à pigmentação, em inoculações de uma amostra padrão de *Mycobacterium paratuberculosis* em ovos embrionados. Trata-se da amostra "strain 7", recebida de Hannover, por gentileza do Sr. Professor Dr. Wagener, sem maiores detalhes.

Nassal<sup>9</sup>, quando se refere à modificação da fórmula do meio de Petraghani, em que aumentou consideravelmente a quantidade da gema de ovos, diz que este aumento favoreceu a formação do pigmento das diversas amostras de *Mycobacterium tuberculosis*.

Estamos presentemente realizando inoculações experimentais, desta amostra de *Mycobacterium paratuberculosis* isolada em ovos embrionados, em bovinos e ovinos, assim como em ovos embrionados por outras vias que não o saco da gema.

## V. RESUMO

A autora trabalhando com uma suspensão de gânglios linfáticos mesentéricos, de um bovino com Paratuberculose, isolou o *Mycobacterium paratuberculosis* em ovos de galinha embrionados. Foram utilizados para o isolamento ovos com 4 dias de incubação, e as inoculações foram feitas no saco da gema com a suspensão de gânglios adicionada de vitamina K. Foi constatado crescimento abundante do *Mycobacterium paratuberculosis* 14 dias após a inoculação, por meio de esfregaços da gema corados pelo método de Ziehl-Neelsen. Culturas feitas a partir da gema e órgãos do embrião em meio de Hohn com glicerina, revelaram crescimento rico de *Mycobacterium paratuberculosis* com pigmento da cor da gema do ovo. É relatada u'a maior granulação dos bacilos após a passagem em ovos embrionados.

## VI. AGRADECIMENTOS

Consignamos os nossos agradecimentos ao Sr. Chefe da Secção de Zoonoses Bacterianas do Instituto de Biologia Animal e ao Professor Dr. Vicente Leite Xavier, pelas facilidades proporcionadas e pelo estímulo recebido durante a execução do presente trabalho. Agradecemos também ao Dr. Renato Augusto da Silva, Chefe da Secção de Zoonoses por Vírus do Instituto de Biologia Animal, por nos ter iniciado na técnica de inoculação em ovos embrionados, pela cessão dos ovos utilizados, assim como pelo incentivo recebido durante a feitura deste trabalho.

## STUDIES ON JOHNE'S DISEASE

### III. ISOLATION OF *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* IN CHICKEN EMBRYOS

#### *Abstract*

The author working with mesenteric lymph nodes from a cattle with Johne's disease, isolated the *Mycobacterium paratuberculosis* in developing chicken embryos. For the isolation were used embryos with 4 days of incubation and the inoculations were made in the yolk sac, with the mesenteric lymph-

nodes suspension added vitamin K. Abundant growth of *Mycobacterium paratuberculosis* were obtained 14 days after egg's inoculation. Cultures made from yolk sac and embryo organs in Hohn's medium with glicerine, revealed luxuriant growth of *Mycobacterium paratuberculosis* with orange pigment. It's related more granulation in the Johne's bacillus after chick embryo passage.

## VIII. REFERÊNCIAS

- 1) BIER, O. (1959). — Bacteriologia e Imunologia — Nona edição — Ed. Melhoramentos, São Paulo — Brasil.
- 2) BOQUET, A. (1925). — Sur les propriétés pathogène du Bacille de Johne (Enterite hypertrophiante des Bovidés) à l'égard du Rat Blanc et de la Souris Blanche. — C. R. Biol. 93, 219-220.
- 3) CAMARGO, F. N., VELASQUEZ, A., VASQUEZ, F. V., GIRON, A. T. & FLORES, F. (1953). — La vacunación contra el derriengue con el virus Flury avianizado. Publicación de Secretaria de Agricultura e Ganadería. México — D.F.
- 4) CHANDLER, R. L. (1961). — Greater susceptibility to *Mycobacterium johnei* of C 57 Black Mice, when compared with CBA and Swiss White Mice. — Nature, Lond. 189, 602-603.
- 5) FRANCIS, J. (1943). — J. Comp. Path. 53, 140, in "Infectious Diseases of Animals — Diseases Due to Bacteria — London — Butterworths Scientific Publications, pag. 319.
- 6) HIRCH, A. (1956). — Infection of Hamsters and Rabbits with *Mycobacterium johnei*. — J. Comp. Path. 66, 260-269.
- 7) KUJUNGEV, I. (1960). — Survival of *Mycobacterium johnei* on solid media and growth on media containing vitamin K. — Zooprofilassi 15, 31-32.
- 8) LOMINSKI, I.; CAMERON, J. & ROBERTS, G. B. S. (1956). — Experimental Johne's Disease in Mice. — J. Path. Bact. 71, 211-222.
- 9) NASSAL, J. (1961). — Experimentelle Untersuchungen über die Isolierung Differenzierung und Variabilität der Tuberculosebakterien — Verlag Paul Parey in Berlin und Hamburg. pag. 17.
- 10) PERDRIX, J. (1952). — La incubación y las enfermedades de los polluelos Ediciones GEA — Barcelona, España, pag. 48.
- 11) RANKIN, J. D. (1957). — Thesis, University of Reading, in "Infectious Diseases of Animals — Diseases Due to Bacteria, London — Butterworths Scientific Publications, pag. 319.
- 12) SILVA, N. M. & PIZELLI, G. N. (1961). — Estudos sobre a Paratuberculose — I — Diagnóstico de um caso da Doença. — Arq. Inst. Biol. Anim. "in press".
- 13) STAVITSKY, A. B. (1946). — Reaction of the Developing Chicken Embryo and the Chorionallantoic Membrane to Inoculation with Various Strains of *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's Bacillus) — Am. J. vet. Res. 7, 470-476.
- 14) TWORT, F. W. (1914). — Vet. News 11, 79, in "Infectious Diseases of Animals — Diseases Due to Bacteria. London — Butterworths Scientific Publications, pag. 319.
- 15) WOOLEY, D. W. & MC CARTER, J. (1940). — Anti-hemorrhagic Compounds as Growth Factors for the Johne's Bacillus — Proc. Soc. exp. Biol. N. York, 45, 357-360.