

ESTUDOS SÔBRE A PARATUBERCULOSE. IV. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE OVINOS COM *Mycobacterium paratuberculosis* DE ORIGEM BOVINA¹

NORMA MORAES DA SILVA²

Sinopse

Foi reproduzida a paratuberculose inoculando ovinos por via oral, com emulsão de gânglios linfáticos mesentéricos e mucosa intestinal lesados, provenientes de um caso positivo de doença de Johnne em bovino. O período de observação variou de 2 a 5 anos e neste período os animais foram submetidos ao controle bacterioscópico das fezes e testes alérgicos com Jonina. Os resultados foram, além disso, baseados no exame necroscópico e presença de bacilos álcool-ácido resistentes nas lesões encontradas na mucosa intestinal e gânglios linfáticos mesentéricos. A infecção por via placentária foi evidenciada pela presença do bacilo de Johnne no baço do feto de um dos animais sacrificados.

INTRODUÇÃO

A reprodução experimental da paratuberculose tem sido obtida por diversos pesquisadores. Assim, Rankin (1957) relata que coelhos com 2 semanas de idade, inoculados intravenosamente, desenvolveram lesões típicas e sintomas da doença. Francis (1943) 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 *et al.* (1956) informam que camundongos inoculados por via venosa ou intraperitoneal eliminaram o bacilo nas fezes por 8 a 16 semanas e que as lesões contendo os bacilos estavam nos intestinos, gânglios linfáticos mesentéricos, fígado e baço. Chandler (1961) realizou um estudo sobre a susceptibilidade comparada entre camundongos C₅₇, CBA e o suíço branco, verificando que o C₅₇ é mais sensível à infecção com o *Mycobacterium johnei* do que os outros, conclusão esta que estendeu mais tarde em uma outra publicação (Chandler 1962). Gilmore e Brotherston (1961) verificaram em seu trabalho a sensibilidade do hamster à administração oral do *M. johnei*, utilizando para tal três grupos de 12 hamsters que receberam, por via oral, doses diferentes 1, 10 e 100 milhões de bacilos de Johnne e constataram que as três doses foram infectantes, sendo que as mais altas produziram um índice maior de infecção. A infecção em ovos em-

brionados foi realizada por Stavitsky (1946) que inoculou quatro amostras padrões de *Mycobacterium paratuberculosis* em ovos de galinha embrionados. O referido autor usou para a realização deste trabalho ovos com 11 dias de incubação e as inoculações foram feitas por diversas vias. Das amostras inoculadas apenas uma, "Strain M", apresentou crescimento. Em trabalho anterior (Silva 1961) conseguimos o isolamento do *M. paratuberculosis* em ovos de galinha embrionados, com 4 dias de incubação nos quais inoculamos emulsão de gânglios linfáticos mesentéricos de um bovino com paratuberculose, utilizando o saco da gema. Rankin (1958a) inoculou bezerras por via venosa e bovinos adultos também intravenosamente, verificando que de seis bezerras inoculados, quatro adoeceram com sintomas clínicos de paratuberculose, comprovada nas fezes e no exame "post-mortem". Os adultos inoculados não adoeceram durante um período de observação de 4 anos, mas os gânglios linfáticos mesentéricos examinados "post-mortem", continham o *M. johnei*. Ainda o mesmo autor (Rankin 1962), continuando seus trabalhos sobre a infecção de bovinos, deixou sete vacas adultas num foco natural da doença por 4 anos e constatou, após esse período, que apenas uma adoeceu e das outras seis, quatro tinham o *M. johnei* no sistema linfático. Conclui o referido autor que os bezerras são mais sensíveis que os adultos e que o uso da "exposição" para se obter a infecção parece ser um método usável na infecção experimental. McEwen e Samuel (1958) inocularam por via venosa, ovinos com 6 meses de idade, que após um período de 1 até 2 anos de inoculados foram sacrificados, verificando que no primeiro ano apesar de os animais estarem

¹ Recebido para publicação em 6 de março de 1967. Boletim Técnico n.º 56 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

² Veterinário do Serviço de Pesquisas de Patologia Animal do IPEACS, Km 47, Campo Grande, GB. ZC-26.

aparentemente sadios, foi isolado o *M. johnei* dos gânglios linfáticos mesentéricos. Os outros animais também apresentaram resultados positivos às culturas dos gânglios linfáticos mesentéricos. Borodenok (1959) inoculou ovinos adultos com 4½ e 5½ anos de idade por via oral, encontrando modificações histológicas positivas 3 meses após a inoculação. Gilmour e Brotherton (1962) inocularam ovinos por via oral com uma dose de 10⁹ bacilos de uma cultura de *M. johnei* e verificaram que após 7 dias a infecção estava confinada à mucosa intestinal e/ou aos gânglios retrofaringeanos. Referem-se também, neste trabalho, à hipótese de a mucosa intestinal ser o local mais provável da infecção primária e de multiplicação do *M. johnei* em ovinos.

O objetivo do presente trabalho é demonstrar a reprodução experimental da paratuberculose em ovinos inoculados por via oral, com emulsão de gânglios linfáticos mesentéricos e mucosa intestinal lesada de um bovino doente.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a infecção dos ovinos utilizamos emulsões de gânglios linfáticos mesentéricos e mucosa intestinal lesada, provenientes de um bovino no qual diagnosticáramos a paratuberculose.

Preparo da emulsão. A emulsão usada como inoculum foi preparada a partir de gânglios linfáticos mesentéricos e mucosa intestinal lesada de um bovino com paratuberculose e obtida pela trituração em liquidificador de uma parte de material para quatro partes de soro fisiológico a 8,5 por mil.

Animais usados para a inoculação. Foram utilizados cinco ovinos com um ano de idade, sendo três machos e duas fêmeas, recebendo cada ovino uma dose única de 20 ml da emulsão por via oral. Os animais foram observados por um período de até 5 anos após a inoculação.

Para o diagnóstico da paratuberculose nos ovinos realizamos: 1) provas alérgicas, 2) exame bacterioscópico das fezes, 3) exame necroscópico, 4) exame microscópico dos gânglios linfáticos mesentéricos, da mucosa intestinal, do fígado, baço e pulmão do feto.

Provas alérgicas: antes de serem inoculados, os animais foram submetidos ao teste simultâneo com tuberculina (mamíferos) e jonina, por via intradérmica. Após a infecção, os animais foram novamente submetidos à prova da jonina.

Exame bacterioscópico das fezes: para o exame bacterioscópico das fezes foram feitos esfregaços em lâminas de vidro e posterior coloração pelo método de Ziehl-Neelsen.

Exame necroscópico: foram realizadas necrópsias dos animais, pesquisando-se a presença de lesões macroscópicas de paratuberculose.

Exames bacterioscópicos dos gânglios linfáticos mesentéricos, da mucosa intestinal, fígado, baço e pulmão do feto: para tal fim, foram feitas seções dos órgãos e esfregaços em lâminas de vidro e corados pelo método de Ziehl-Neelsen.

RESULTADOS

Ovino n.º 1. Este animal, como os demais usados neste trabalho, apresentou reação negativa ao teste simultâneo com tuberculina e jonina feito antes de efetuarmos as inoculações. A prova de jonina repetida 2 meses após as inoculações produziu resultado suspeito. As fezes apresentavam-se na época pouco consistentes, mas a pesquisa bacterioscópica do *Mycobacterium paratuberculosis* foi negativa. Esse animal entrou em emagrecimento e 3 meses depois da inoculação apresentou uma crise diarréica, constatando-se então bacterioscopicamente, nas fezes, a presença do bacilo de Johne. O animal continuou apresentando crises intermitentes de diarréia e discreto emagrecimento, e assim como os demais inoculados, foi periodicamente submetido à prova de jonina, apresentando sempre resultado positivo. Foi sacrificado 5 anos após a inoculação, já bem emagrecido, e à necrópsia foram verificadas lesões características de paratuberculose no intestino, isto é, mucosa espessada com aspecto cerebelóide (Fig. 1), lesão esta que não se apresentou em forma contínua, e hipertrofia dos gânglios linfáticos mesentéricos. O bacilo de Johne foi evidenciado em esfregaços por compressão da superfície cortada dos gânglios linfáticos mesentéricos e raspados da mucosa intestinal.

Ovino n.º 2. Apresentou reação negativa à jonina 2 meses após a inoculação. Cerca de 3 meses depois da inoculação apresentou uma crise diarréica de intensidade apreciável, sendo constatada bacterioscopicamente, nas fezes, a presença de *M. paratuberculosis*. A partir de então este animal passou a reagir positivamente à jonina. Foi sacrificado já em caquexia, decorridos 3 anos e 2 meses da inoculação, constatando-se à necrópsia coleção de líquido na cavidade abdominal e lesões características de paratuberculose no intestino e hipertrofia dos gânglios linfáticos mesentéricos. Foi evidenciado o bacilo de Johne em esfregaços por compressão da superfície cortada dos gânglios linfáticos mesentéricos e em raspados da mucosa intestinal.

Ovino n.º 3. Esse ovino morreu 2 anos após a inoculação, por causa intercorrente, não se encontrando à necrópsia lesões macroscópicas de paratuberculose.

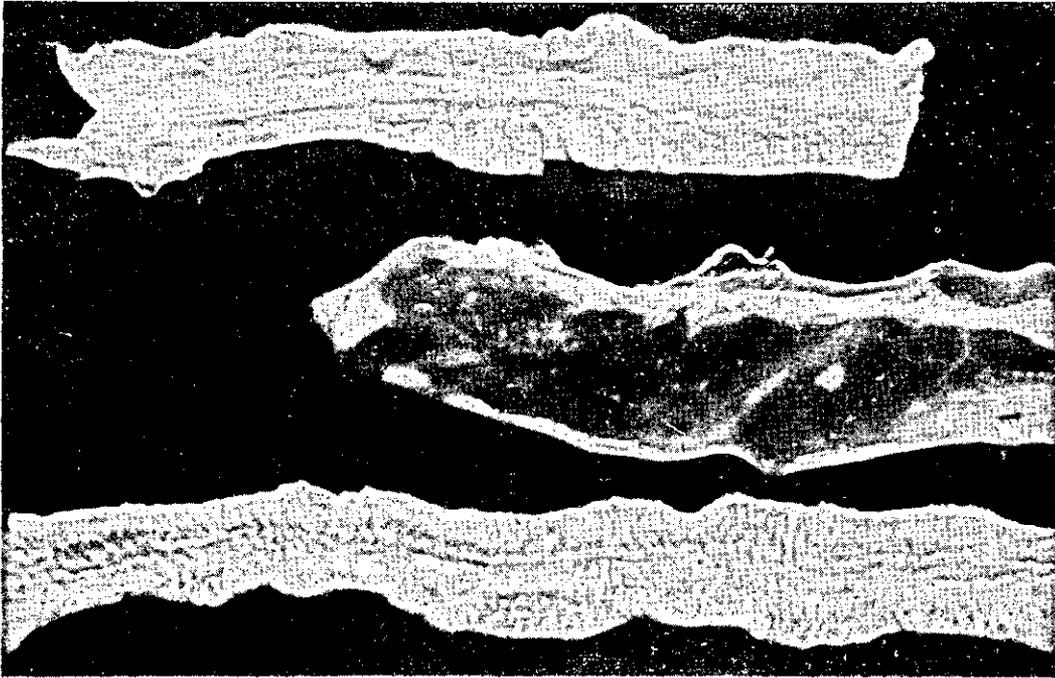


FIG. 1. Fragmentos de intestino do Ovino n.º 1, com lesões de paratuberculose (A e C). Fragmento de intestino do mesmo animal, sem lesão (B).

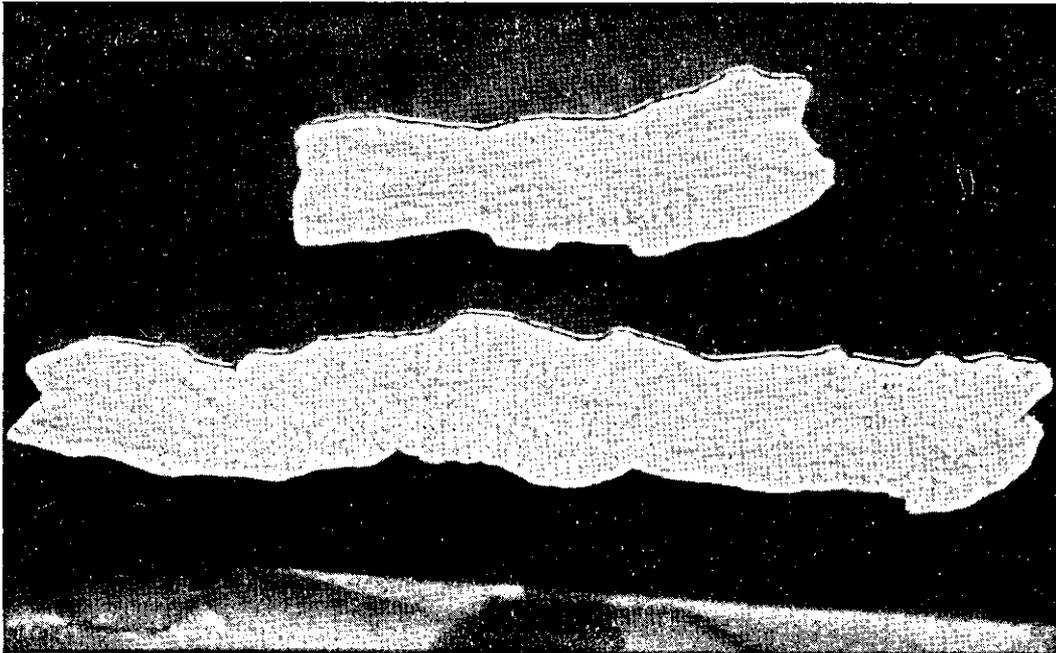


FIG. 2. Fragmentos de intestino do Ovino n.º 5, com lesão de paratuberculose.

Ovino n.º 4. Apresentou reação positiva à jonina e resultados positivos nos exames bacterioscópicos das fezes. Morreu por causa intercorrente, não nos sendo possível realizar a necrópsia.

Ovino n.º 5. Tratava-se de uma fêmea que foi aasalada com um dos animais inoculados (Animal n.º 1) e que estava aproximadamente com 3 meses de gestação quando foi sacrificada, decorridos 5 anos da inoculação. Apresentou à necrópsia lesões típicas de paratuberculose no intestino (Fig. 2) e hipertrofia

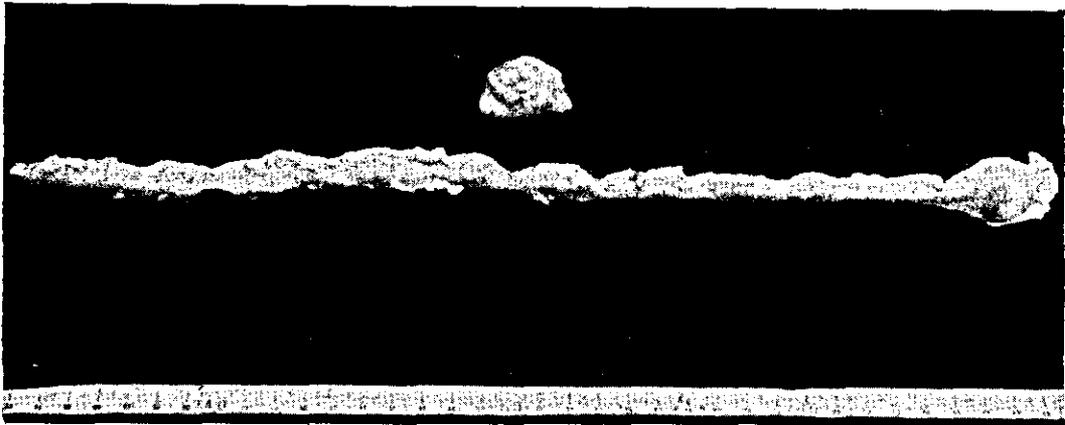


FIG. 3. Gânglios linfáticos mesentéricos hipertrofiados, do Ovino n.º 5.

acentuada dos gânglios linfáticos mesentéricos (Fig. 3). O feto era macho e não apresentava lesões macroscópicas em nenhum órgão. Exames bacterioscópicos da mucosa intestinal e gânglios linfáticos mesentéricos da ovelha resultaram positivos. Do feto obtivemos resultado positivo ao exame bacterioscópico do baço, sendo negativos os exames do pulmão, fígado e intestinos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os animais usados neste trabalho foram previamente submetidos ao teste alérgico simultâneo com tuberculina obtida de amostras humana e bovina, e com jonina, testando-se assim a sensibilidade dos mesmos. Decorridos 2 meses da inoculação dos ovinos com a emulsão de gânglios linfáticos mesentéricos e mucosa intestinal contendo o bacilo de Johne, realizamos novo teste alérgico com jonina. Quatro animais reagiram à inoculação e o outro apresentou resultado negativo. Os testes alérgicos foram repetidos periodicamente obtendo-se reação positiva até o final do período de observação dos animais, com pequenas variações.

Ficou demonstrada a transmissão intra-uterina da paratuberculose pelo achado do bacilo de Johne em

esfregaços de baço do feto do Animal n.º 5, achado este que concorda com o exposto por Doyle (1959) e por Rankin (1961). Verificamos também que, como já relatou Rankin (1958b), a amostra de *M. paratuberculosis* de origem bovina pode infectar ovinos.

Os experimentos realizados mostram que:

- 1) a paratuberculose foi obtida em quatro ovinos por infecção oral;
- 2) a amostra de *M. paratuberculosis* de origem bovina infectou ovinos;

- 3) ocorreu a infecção intra-uterina, comprovada pelo achado do bacilo de Johne no baço do feto de um dos animais inoculados.

REFERÊNCIAS

- Borodenok, A. I. 1959. Pathogenesis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Veterinariya, Moscow*, 36 (12): 17-21. (Vet. Bull. 30 (7), Abstr. 2073)
- Chandler, R. L. 1961. Infection of laboratory animals with *M. johnei*. IV. Comparative susceptibility of C57, CBA and Swiss white mice. *J. comp. Path.* 71: 233-242.
- Chandler, R. L. 1962. Infection of laboratory animals with *M. johnei*. V. Further studies on the comparative susceptibility of C57, black mice. *J. comp. Path.* 72: 198-213.
- Doyle, T. M. 1959. Johne's disease, p. 319. In Stableforth, A. W. & Galloway, I. A. (ed.), *Infectious diseases of animals - Diseases due to bacteria*. Butterworths Scientific Publications, London.
- Francis, J. 1943. *J. comp. Path.* 53: 140. (Citado por Doyle 1959)
- Gilmour, N. J. L. & Brotherston, J. G. 1961. Susceptibility of hamsters to the oral administration of *M. johnei*. *Nature, London*, 192: 1202-1203.
- Gilmour, R. J. L. & Brotherston, J. G. 1962. Quantitative studies of *M. johnei* in the tissues of sheep. IV. The distribution of *M. johnei* shortly after oral dosing. *J. comp. Path.* 72: 165-169.
- Lominsky, I., Cameron, J. & Roberts, G. B. S. 1956. Experimental Johne's disease in mice. *J. Path. Bact.* 71: 211-222.

- McEwen, A. D. & Samuel, I. McA. 1958. The intravenous inoculation of sheep with graded doses of *M. johnei*. J. comp. Path. 68: 45-53.
- Rankin, J. D. 1957. Thesis, University of Reading. (Citado por Doyle 1959)
- Rankin, J. D. 1958a. The experimental infection of cattle with *M. johnei*. I. Calves inoculated intravenously. J. comp. Path. 68: 331-337.
- Rankin, J. D. 1958b. The present knowledge of Johne's disease. Vet. Rec. 70: 693-697.
- Rankin, J. D. 1961. Recent research on Johne's disease in the United Kingdom. Vet. Bull. 32 (3): 127-131.
- Rankin, J. D. 1962. The experimental infection of cattle with *M. johnei*. IV. Adult cattle maintained in an infectious environment. J. comp. Path. 72: 113-117.
- Silva, N. M. 1961. Estudos sobre a paratuberculose. III. Isolamento do *M. paratuberculosis* em embrião de galinha. Arq. Inst. Biol. Animal, Rio de Janeiro, 4: 179-183.
- Stavitsky, A. B. 1946. Reaction of the developing chicken embryo and the chorioallantoic membrane to inoculation with various strains of *M. paratuberculosis*. Am. J. vet. Res. 7: 470-476.

STUDIES ON PARATUBERCULOSIS. IV. EXPERIMENTAL INFECTION OF SHEEP
WITH *Mycobacterium paratuberculosis* OF BOVINE ORIGIN

Abstract

The author obtained positive results to inoculation, by oral route, in sheep, with a mesenteric lymph node and intestinal mucosa emulsion from a bovine with Johne's disease. The observation period was of 2 to 5 years. During this period the sheep were tested with johnin and bacterioscopic examination of faeces were made. Evidence of infection was obtained from microscopic examination and determination of the presence of alcohol-acid resistant bacillus in the intestinal mucus and mesenteric lymphatic glands. The intra-uterine infection was demonstrated by the presence of Johne's bacillus in the spleen of the foetus from one of the positive sheep.