

Micobacterioses em ovinos (*Ovis aries*). Correlação entre teste imunoalérgico, cultivo e histopatológico.

Micobacteriosis en ovinos (*Ovis aries*). Correlación entre test imunoalérgico, cultivo e histopatológico.

Mycobacteriosis of ovine (*Ovis aries*). Correlation between immuno-allergic, culture and histopathologic tests.

MARCONDES, A.G PhD; **ALMEIDA, C.A.S**; **CHIMARA, E**; **CYRILLO, F.C**; **MORATO, F.**; **MAIORKA, P.C.** PhD; **BENITES, N.R.** PhD; **MELVILLE, P.A.** PhD; **DIAS, R.A.** PhD; **RIZZO, H.**; **BENESI, F.J.** PhD; **VASCONCELLOS, S.A.** PhD; **PINHEIRO, S.R.** PhD*

RESUMO: Existem poucos dados sobre tuberculose e micobacterioses em ovinos (*Ovis aries*) baseados em isolamento e tipificação de microorganismos presentes em linfonodos e lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Foram submetidos ao teste tuberculínico e abatidos 57 ovinos das raças Santa Inês e Texel divididos em dois grupos: A) animais com reação ao PPD bovino maior que ao PPD aviário (média: 0,34 mm ± 0,22) e B) reação ao PPD bovino menor que ao PPD aviário (média: -1,19 mm ± 1,46). Dos 57, onze animais (19,3%) apresentaram na necrópsia lesões sugestivas de tuberculose. Os órgãos mais afetados foram o fígado, linfonodo submandibular, intestino, pulmão, linfonodo mediastino e glândula mamária. Foram isoladas micobactérias de sete animais (12,3%) e a tipificação genética pelo método de PRA demonstrou cinco (71,42%) infectados pelo *Mycobacterium flavescens* 1, um (14,28%) pelo *M. kansasii*, e um (14,28%) por micobactéria pertencente ao Complexo *M. tuberculosis*. De todos os animais abatidos houve isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em quatro (7,01%), havendo isolamento simultâneo de micobactérias e de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em dois (3,5%). Os exames histopatológicos apontaram em nove animais (15,78%) a presença de granuloma e coloração de Ziehl-Neelsen positivo. A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que os testes imunoalérgicos não foram capazes de diferenciar infecção provocada pelo *M. flavescens* 1, *M. kansasii*, complexo *M. tuberculosis* e *C. pseudotuberculosis*. Nos exames macroscópico e histopatológico lesões provocadas por *M. flavescens* 1, *M. kansasii*, e *C. pseudotuberculosis* não foram diferenciáveis das provocadas pelo complexo *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, micobacteriose, ovinos.

* **Endereço:** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP; Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo (SP) Brasil, CEP: 05508-000. E-mail: soniapin@usp.br,

ABSTRACT: There are few data on ovine (*Ovis aries*) tuberculosis and mycobacteriosis based on isolation and typing of microorganisms present in lymph nodes and tuberculosis-like gross lesions. A total of 57 Santa Inês and Texel ovine breeds were submitted to tuberculin skin test, slaughtered and divided in two groups: A) animals with bovine PPD reaction more intense than to avian PPD (mean: 0.34 mm ± 0.22) and B) reaction to bovine PPD less intense than avian PPD (mean: -1.19 mm ± 1.46). From all 57 animals, eleven (19.3%) presented tuberculosis-like gross lesions at necropsy. More affected organs were liver, submandibular lymph nodes, intestines, lungs, mediastinic lymph nodes and mammary gland. Mycobacteria was isolated from seven animals (12.3%) and genetic typing through the PRA method showed five animals (71.42%) infected with *Mycobacterium flavescens* 1, one (14.28%) with *M. kansasii*, and one (14.28%) with *M. tuberculosis* complex mycobacteria. Of all slaughtered animals there was isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in four (7.01%), with concomitant isolation of mycobacteria and *Corynebacterium pseudotuberculosis* in two of them (3.5%). Histopathologic examination demonstrated the presence of granuloma and positive Ziehl-Neelsen staining in nine animals (15.78%). Results analysis allowed concluding that immuno-allergic tests were not capable to differentiate infection caused by *M. flavescens* 1, *M. kansasii*, *M. tuberculosis* complex and *C. pseudotuberculosis*. During gross examination and histopathologic tests lesions caused by *M. flavescens* 1, *M. kansasii*, and *C. pseudotuberculosis* were not distinguishable from those caused by *M. tuberculosis* complex.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mycobacteriosis, ovine.

INTRODUÇÃO

Relatos de tuberculose em ovinos são escassos sendo, na maioria das vezes, observados por ocasião do abate (MALONE et al., 2003), entretanto, doenças como a Linfadenite Caseosa (LC) e as micobacterioses estão entre os agentes que podem provocar lesões granulomatosas semelhantes às da tuberculose.

Para confirmar o diagnóstico da tuberculose e/ou micobacterioses na avaliação *post-mortem* os exames bacteriológicos e histopatológicos das lesões macroscópicas assumem papel de destaque servindo também para o controle com o diagnóstico realizado no campo com a avaliação da eficácia das provas tuberculínicas (SILVA et al. 2006)

Os testes imunoalérgicos aplicados ao diagnóstico de tuberculose nos bovinos são mundialmente difundidos e aceitos, entretanto, para os pequenos ruminantes ainda não há consenso nos parâmetros a serem utilizados (CORDES, et al., 1981; MALONE et al., 2003).

Utilizando a chave de interpretação da prova de tuberculina preconizada por Cyrillo et al. (2007), ovelhas reagentes foram abatidas e o material de necrópsia foi encaminhado ao laboratório com o objetivo de isolar e tipificar microorganismos presentes em lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose

e/ou micobacteriose, verificando a correlação entre os agentes isolados, o resultado do teste imunoalérgico e do exame histopatológico.

MATERIAL e METODOS:

Foram submetidas à prova de tuberculina (CYRILLO et al., 2007) ovelhas da raça Santa Inês e Texel, com mais de seis meses de idade e sem alterações físicas visíveis no momento da seleção. Na tuberculinização utilizou-se o PPD aviário contendo 0,5 mg/mL de tubérculo-proteína e o PPD bovino contendo 1 mg/mL. No dia da leitura, efetuada 72hs p.i., 57 animais foram selecionados segundo o resultado ao Teste Comparativo Cervical (TCC): 31 com reação a tuberculina bovina superior a aviária (? PPD Bv – ? PPD Av = 0) e 26 com reação a tuberculina bovina inferior a aviária (? PPD Bv – ? PPD Av < 0). Os animais foram então submetidos ao exame clínico, abate, necropsia e colheita de material para exames bacteriológicos e histopatológicos.

Para efeito de diagnóstico diferencial, priorizou-se nesta etapa o isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente da linfadenite caseosa. Para o isolamento de possíveis micobactérias foram utilizados os meios de Stonebrink e Löwenstein-Jensen. As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen e, uma vez confirmada a característica de bacilo álcool resistência (BAAR), tipificadas pela técnica de PCR-Restriction Enzyme Analysis (TELENTI et al., 1993)

A verificação da hipótese de associação entre as reações ao Teste Comparativo Cervical e a positividade para micobactérias (dada pelo isolamento e histopatológico) foi efetuada pelo teste exato de Fisher, com o nível de significância adotado de 0,05 (SAMPAIO, 2002).

RESULTADOS e DISCUSSÃO:

Dos 57, onze animais (19,3%) apresentaram na necropsia lesões sugestivas de tuberculose. Os órgãos mais afetados foram o fígado, linfonodo submandibular, intestino, pulmão, linfonodo mediastino e glândula mamária. Foram isoladas micobactérias de sete animais (12,3%) e a tipificação genética pelo método de PRA demonstrou cinco (71,42%) infectados pelo *Mycobacterium flavescens* 1, um (14,28%) pelo *M. kansasii*, e um (14,28%) por micobactéria pertencente ao complexo *M. tuberculosis*. (Tab 1). Os exames histopatológicos apontaram em nove animais (15,78%) a presença de granuloma e coloração de Ziehl-Neelsen positivo.

De todos os animais abatidos houve isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em quatro (7,01%), havendo isolamento simultâneo de micobactérias e de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em dois (3,5%). 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 de 50 a 60% da linfadenite caseosa em ovinos. Não foi encontrada na literatura consultada, descrição de isolamentos concomitantes, de micobactérias e *C. pseudotuberculosis*, para a espécie ovina.

O TCC tem sido 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. Os dois grupos de animais utilizados apresentaram reações do PPD bovino maior que ao PPD aviário (média: 0,34 mm ± 0,22) e reação ao PPD bovino menor que ao PPD aviário (média: -1,19 mm ± 1,46). Estas reações estariam classificadas como **negativas** pelo padrão adotado (CYRILLO et al.,2007) já que o animal é considerado negativo para a tuberculose quando o aumento da espessura de pele provocada pelo PPD bovino é menor que a aviária ou maior em até 0,99mm.

Houve crescimento de micobacterias e *C. pseudotuberculosis* no material de alguns dos animais testados e a análise dos resultados obtidos permitiu concluir que os testes imunoalérgicos não foram capazes de diferenciar infecção provocada pelo *M. flavescens 1*, *M. kansasii*, complexo *M. tuberculosis* e *C. pseudotuberculosis*. Nos exames macroscópico e histopatológico lesões provocadas por *M. flavescens 1*, *M. kansasii*, e *C. pseudotuberculosis* não foram diferenciáveis das provocadas pelo complexo *M. tuberculosis*.

Tabela 1– Natureza do resultado dos testes imunoalérgicos, lesões macroscópicas encontradas e órgãos colhidos na necropsia de ovinos que apresentaram crescimento bacteriológico.

Animal	TCC (mm)	Lesões	Material Coletado	resultado
129	0,2	LSM	LSM com lesão e LMS	<i>C. pseudotuberculosis</i> <i>M. flavescens 1</i>
131	0,1	-	LSM, LMD e LMS	<i>M. flavescens 1</i>
197	0,3	Fígado e LSM	LSM com lesão, LMD, LMS e Fígado	<i>M. flavescens 1</i>
342	0,3	Pulmão e gl. mam.	LSM, LMD, LMS, pulmão, gl. mam.	<i>C. pseudotuberculosis</i>
352	0,3	LMD	LSM, LMD com lesão e LMS	<i>M. flavescens 1</i>
552	0,5	-	LSM, LMS	<i>C. pseudotuberculosis</i>
648	-0,7	-	LSM, LMD e LMS	<i>C. pseudotuberculosis</i> c. <i>M. tuberculosis</i>
690	0,5	-	LSM, LMD e LMS	<i>M. kansasii 1</i>
727	0,6	-	LSM, LMD e LMS	<i>M. flavescens 1</i>

TCC: Resultado, em mm, da diferença ? PPD Bv - ? PPD Av

LMD: linfonodos mediastínicos

-: ausência de lesão visível

LMS: linfonodos mesentéricos

LSM: linfonodos submandibulares

Gl. mam.: Glândula Mamária

CONCLUSÕES

Há necessidade de se aprimorar o diagnóstico diferencial das micobacterioses, linfadenite caseosa e tuberculose dos ovinos.

REFERÊNCIAS

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.

CYRILLO, F.C; PINHEIRO, S. R.; LEAL, M. L. R.; MORENO.A.; MOTTA, P. M. P. C.; SINHORINI, I. L.; VASCONCELLOS, S. A.; BENESI, F. J. Teste de tuberculinização em ovinos (*Ovis aries*) experimentalmente sensibilizados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.3, p.191-197, 2007.

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.

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.

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.

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.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY,F.; BÖTTGER, E.C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinic Microbiology**, v.31, p.175-178, 1993.