

ESTUDOS SÔBRE A PARATUBERCULOSE

II. ISOLAMENTO DA AMOSTRA DE *MYCOBACTERIUM* *PARATUBERCULOSIS* EM MEIO DE HOHN *

NORMA MORAES DA SILVA **

I. INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium paratuberculosis* foi cultivado pela primeira vez em meio de cultura artificial por Twort e Ingram¹⁰, que utilizaram um meio de ovo glicerinado contendo 0,5 a 1,0% de bacilo tuberculoso. Este meio, com pequenas modificações é ainda usado para o isolamento deste microrganismo, podendo conter 4% de glicerina e cêrca de 1,0% de 'substância essencial', que é sintetizada por outros membros do grupo álcool-acido resistente. Um meio de ovo baseado no meio de Finlayson foi também usado com bons resultados por Taylor⁹ em 1950. A "substância essencial" é geralmente suprida pela adição ao meio de cultura, de um extrato glicerinado de *Mycobacterium phlei*. O trabalho de Wooley e Mc Carter¹¹, em 1940, mostrou que o "phthiocol", isolado de bacilos álcool-ácido resistentes por Newman, Crowman, e Anderson⁷, em 1934, supria em parte o fator essencial para o crescimento do *Mycobacterium paratuberculosis*. Almquist e Klose¹ em 1939 demonstraram que o phthiocol possuía as propriedades antihemorrágicas da vitamina K. Wooley e Mc Carter usaram a vitamina K sintética, com resultado satisfatório, mas o crescimento foi mais lento e menos brilhante do que quando o fator essencial era suprido por extratos de *Mycobacterium phlei*. Kujumgiev⁶ em 1960, usou o meio de Finlayson, substituindo o extrato de *Mycobacterium phlei* por vitamina K sintética, também com resultado satisfatório.

Um notavel avanço para o cultivo do *Mycobacterium paratuberculosis* foi obtido por Francis, Macturk, Madinaveitia e Snow⁵ quando isolaram o "fator essencial" do *Mycobacterium phlei*, que chamaram de "Mycobactin". Ensaios preliminares com Mycobatin em meio de ovo deram excelentes resultados.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* realizamos sementeiras de suspensões de gânglios linfáticos mesentéricos em meio de Hohn².

Estes gânglios linfáticos provinham de um bovino no qual diagnosticamos a paratuberculose³.

Preparo da Suspensão: — A suspensão de gânglios linfáticos mesentéricos foi feita a partir do gânglio ileo-cecal e mais 4 outros gânglios mesentéricos,

* 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.

e obtida da seguinte maneira: — após flambagem da superfície dos gânglios com uma espátula de metal fortemente aquecida na chama do bico de Bunsen, retirou-se fragmentos de cerca de 1 cm², os quais foram colocados em gral esteril. Em seguida estes materiais foram triturados com o auxílio de um pistilo previamente esterilizado, adicionando-se 30 ml de soro fisiológico esteril, a 8,5 por mil. O volume da suspensão obtida foi medido e dividido em 2 partes, A e B.

Suspensão A, com vitamina K: — à parte A da suspensão obtida adicionou-se vitamina K 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.	20,0 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 linfáticos mesentéricos foi utilizada sem adição de quaisquer substâncias.

Semeadura no meio de Hohn: — o meio de Hohn se compõe, em linhas gerais, de uma solução de sais minerais, emulsão de batatas, ovos e glicerina, tendo como impediendo o verde de malaquita. Neste meio foram semeados as suspensões A e B, sendo utilizados 20 tubos para cada suspensão.

Após a semeadura os tubos foram fechados com parafina, para evitar o ressecamento do meio, e incubados em estufa bacteriológica a 37°C.

Exame bacterioscópico das culturas: — para a realização do exame bacterioscópico das culturas, foram feitos esfregaços do crescimento, os quais coramos pelo método de Ziehl-Neelsen ².

III. RESULTADOS

Os resultados obtidos das semeaduras no meio de Hohn, podem ser sumarizados da seguinte forma:

Suspensão A, com vitamina K: — decorridas 5 semanas de semeadura da suspensão de gânglios linfáticos mesentéricos, adicionados de vitamina K, nos tubos contendo meio de Hohn, verificou-se em 3 destes tubos o crescimento de algumas colônias circulares, lisas, branco esverdeadas, com aproximadamente 0,5 mm de diâmetro. Uma semana mais tarde observamos crescimento idêntico em mais 8 tubos. O exame bacterioscópico destas colônias revelou crescimento puro de bacilos álcool-acido resistentes, finos, curtos e retos.

A primeira repicagem do crescimento obtido foi feita também em meio de Hohn. Para a realização desta repicagem o crescimento foi suspenso em um volume conhecido de soro-fisiológico esteril a 8,5 por mil, adicionando-se a esta suspensão vitamina K, na mesma proporção usada para a suspensão de gânglios. O crescimento nestes tubos foi idêntico ao obtido no isolamento inicial, porem mais abundante e pode ser observado decorridas 4 semanas de incubação em estufa a 37°C.

A segunda repicagem foi realizada sem adição de vitamina K à suspensão do crescimento, obtendo-se desenvolvimento idêntico ao da 1.^a repicagem.

Suspensão B, sem vitamina K: — Os tubos semeados com a suspensão B, permaneceram incubados em estufa a 37°C durante 12 semanas, sem se verificar crescimento do *Mycobacterium paratuberculosis*.

IV. COMENTÁRIOS

Anteriormente a este trabalho já havíamos tentado o isolamento do *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de materiais provenientes dos casos de Paratuberculose descritos por Dacorso e cols.³. Estes materiais eram constituídos de fragmentos de mucosa intestinal, dos quais realizamos exames bacterioscópicos comprovando a presença de aglomerados de bacilos-alcool-acido resistentes. A semeadura foi realizada em meio de Hohn, sem adição de vitamina K às suspensões de mucosa intestinal. Os tubos permaneceram 3 meses na estufa a 37°C, não se conseguindo crescimento do *Mycobacterium paratuberculosis*.

Ao contrário de Woolley e Mc Carter¹¹ e Kujungiev⁸ que utilizaram a vitamina K no meio de cultura, adicionamos esta vitamina à suspensão de gânglios a ser semeada.

O tipo de crescimento do *Mycobacterium paratuberculosis*, por nós obtido no meio de Hohn, está de acordo com o descrito por Doyle⁴ quando se refere ao crescimento deste microrganismo em meios sólidos.

V. RESUMO

A autora trabalhando com gânglios linfáticos mesentéricos, provenientes de um bovino sacrificado para a comprovação do diagnóstico da Doença de Johne⁸, isolou, pela primeira vez no Brasil, o *Mycobacterium paratuberculosis*. O meio de cultura usado para o isolamento foi o meio de Hohn, empregando-se como artifício de técnica, a adição de vitamina K à suspensão de gânglios semeada.

VI. AGRADECIMENTO

A autora agradece ao Dr. Leonhard Riedmüller, Chefe da Seção de Zoonoses Bacterianas do Instituto de Biologia Animal, pelas facilidades proporcionadas durante a execução do presente trabalho.

STUDIES ON JOHNE'S DISEASE

II. ISOLATION OF THE *MYCOBACTERIUM JOHNEI* IN HOHN'S MEDIUM*Abstract*

The author working with mesenteric lymph nodes, from a bovine sacrificed to the comprovation of Johne's Disease, isolated the *Mycobacterium johnei*, for the first time in Brazil. The isolation was made on Hohn's medium, adding vitamin K to the lymph nodes suspension.

VII. REFERÊNCIAS

- 1) ALMQUIST, H. J. & KLOSE, A. A. (1939). — The Anti-Hemorrhagic Activity of Pure Synthetic Phthiocol. *J. A. chem. Soc.* 61: 1611.
- 2) BIER, O. (1959). — *Bacteriologia e Imunologia*. Nona edição. Ed. Melhoramentos, São Paulo, Brasil, pag. 784.
- 3) DACORSO, P. F.; CAMPOS, I. O. N.; FARIA, J. F. & LANGENEGGER, J. (1960). — Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. *Arq. Inst. Biol. Anim.* 3: 129-139.
- 4) DOYLE, T.M. (1959). — *Infectious Diseases of Animals — Diseases Due To Bacteria*. London, Butterworths Scientific Publications pag. 321.

- 5) FRANCIS, J.; MACTURK, H. M.; MADINAVEITIA, J. & SNOW, J. A. (1953). — Mycobactin a Growth Factor for *Mycobacterium johnei*. I — Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. J.* 55: 596-607.
- 6) KUJUMGIEV, I. (1960). — Survival of *Mycobacterium johnei* on Solid Media and Growth on Media Containing Vitamin K. *Zooprofilassi* 15: 31-32.
- 7) NEWMAN, M. S.; CROWDER, J. A. & ANDERSON, R. J. (1934). — The Chemistry of the Lipids of Tubercle Bacilli — XXXVIII — A New Synthesis of Phthiocol, the Pigment of Human Tubercle Bacilli. *J. Biol. Chem.* 105: 279-281.
- 8) SILVA, N. M. & PIZELLI, G. N. (1961). — Estudos sôbre a paratuberculose — I Diagnóstico de um caso da doença. *Arq. Inst. Biol. Anim.* neste vol.
- 9) TAYLOR, A. W. (1950). — Observations on the Isolation of *Mycobacterium johnei* in Primary Culture. *J. Path. Bact.* 62: 647.
- 10) TWORT, F. W. & INGRAM, G. L. (1913). — *Johne's Disease* — *Baillière, Tindall and Cox*, London.
- 11) WOOLEY, D. W. & Mc CARTER, J. (1940). — Anti-Hemorrhagic Compounds as Growth Factor for the *Johne's Bacillus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. York* 45: 357-360.