

Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina

[Ziehl-Neelsen staining as a fast method in the diagnosis of ovine paratuberculosis]

A.C. Coelho^{1,3}, M.L. Pinto¹, A.M. Coelho², J. Rodrigues^{1,3}

¹Departamento de Ciências Veterinárias
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
5001-911 – Vila Real, Portugal

²Direcção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes – Mirandela, Portugal

³CECAV Portugal

RESUMO

Estudou-se a presença de bacilos álcool-ácido resistentes compatíveis com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em esfregaços de fezes e tecidos de ovinos. Vinte e seis esfregaços de fezes e 104 de tecidos, pertencentes a 26 animais diagnosticados como paratuberculosos, foram analisados pelo método de Ziehl-Neelsen. Dezesesseis (61,5%) esfregaços fecais apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes compatíveis no exame microscópico. Vinte animais (76,9%) foram diagnosticados pelo método nos esfregaços de tecidos. Vinte e um animais apresentaram esfregaços positivos nas fezes e nos tecidos, simultaneamente. A sensibilidade de Ziehl-Neelsen para os esfregaços fecais, esfregaços de tecidos e para a combinação de ambos foi de 61,5%, 76,9% e 80,8%, respectivamente.

Palavras-chave: ovino, paratuberculose, Ziehl-Neelsen, esfregaço, diagnóstico

ABSTRACT

The presence of acid-fast bacilli compatible with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in fecal and tissues smears was investigated using the Ziehl-Neelsen staining. A total of 26 fecal smears and 104 tissues smears collected from 26 sheep with confirmed paratuberculosis were analyzed. Sixteen (61.5%) fecal smears showed compatible with acid-fast bacilli on microscopic examination after staining. Twenty animals (76.9%) were diagnosed based on the positivity of tissues smears. The Ziehl-Neelsen sensitivities to faecal smears, tissues smears, and a combination of both were 61.5%, 76.9%, and 80.8%, respectively.

Keywords: ovine, paratuberculosis, Ziehl-Neelsen, smear, diagnosis

INTRODUÇÃO

A paratuberculose, ou doença de Johne, é uma doença de natureza infecciosa causada por *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*. Atinge principalmente os ruminantes, originando uma enterite crónica granulomatosa. A paratuberculose tem longo período de incubação, sendo caracterizada por um quadro de emagrecimento progressivo e fatal, acompanhado com frequência de diarreia (Chiodini et al., 1984).

O método de Ziehl-Neelsen é tradicionalmente usado em laboratórios para o diagnóstico de micobacterioses devido à sua simplicidade e rapidez (Tansuphasiri e Kladphuang, 2002; Kim et al., 2003; Steingart et al., 2006). Quanto ao diagnóstico da paratuberculose, a visualização de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em esfregaços corados mediante a técnica de Ziehl-Neelsen a partir de amostras de fezes, mucosa intestinal ou gânglio linfático, é considerada como uma boa técnica de diagnóstico rápido (European ..., 2000; Kalis et al., 2004; Stewart et al., 2004; Vaughan et al., 2005).

Recebido em 24 de outubro de 2007

Aceito em 2 de setembro de 2008

E-mail: accoelho@utad.pt

Nos casos mais avançados da doença, o diagnóstico não oferece nenhuma dúvida, uma vez que os bacilos são muito abundantes e adotam uma disposição característica em grumos, devido à manutenção da estrutura que têm no interior dos macrófagos. Nos casos em que a quantidade de bacilos é menor, o diagnóstico torna-se mais difícil, na medida em que a amostra que se examina ao microscópio pode não permitir a visualização da micobactéria devido ao fato de ser em pequena quantidade. Na espécie bovina, é freqüente o aparecimento de bacilos com características semelhantes a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, com a única diferença que não formam agregados, podendo induzir a falsas qualificações positivas (Juste e Aduriz, 1990). Contudo, essa técnica apenas fornece um diagnóstico presuntivo de micobacteriose (Collins et al., 1993), apresentando baixa sensibilidade nas fases iniciais da doença, embora, quando o animal se apresenta na fase clínica, atinja virtualmente 100% de sensibilidade (European ..., 2000). Ainda, em relação à sensibilidade, dificilmente proporciona informação nos casos subclínicos. Quando se incluem amostras fecais de animais com infecções clínicas e subclínicas procedentes de explorações com um historial de paratuberculose, a sensibilidade ronda os 36,4% (Zimmer et al., 1999).

Este estudo teve como objectivo determinar a capacidade de diagnóstico do método de Ziehl-Neelsen em esfregaços fecais e de tecidos provenientes de ovinos infectados por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de fezes e de tecidos (íleo, jejuno, válvula íleocecal, gânglio mesentérico) provenientes de 26 ovinos adultos, de ambos os sexos, cujo diagnóstico de paratuberculose foi efetuado com base numa combinação de exames clínico, histológico, microbiológico e sorológico. As amostras de fezes foram colhidas de forma asséptica e individual, mediante extração, direta do reto, com uma luva esterilizada. Posteriormente, foram introduzidas em um tubo esterilizado de polipropileno, devidamente rotulado. As amostras de tecido, obtidas após a morte e evisceração dos animais, também foram

conservadas em recipientes esterilizados de polipropileno. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C. No próprio dia de recepção das amostras efetuou-se no laboratório um esfregaço de fezes, com o objetivo de determinar a presença de micobactérias. O esfregaço foi feito sobre uma lâmina de vidro ocupando toda a superfície da mesma, com a ajuda de um depressor lingual de madeira, sem qualquer diluição prévia. Nos tecidos, fez-se a raspagem da mucosa com lâmina de bisturi e, no caso dos gânglios linfáticos, por impressão direta da porção da amostra sobre a lâmina.

As preparações foram coradas de acordo com o método de Ziehl-Neelsen (Zimmer et al., 1999). Os esfregaços foram fixados à chama e, em seguida, cobertos pelo corante fucsina fenicada. As lâminas foram aquecidas durante cinco minutos, até libertar vapores sem chegar a ferver. Após serem lavadas em água corrente, fez-se a descoloração durante 90 segundos, com solução de álcool-ácido. Passaram-se novamente por água corrente, e procedeu-se ao contraste, durante três minutos, com o corante verde malaquite. Deixaram-se secar em papel de filtro e foram examinadas, pelo menos em 100 campos, com objectiva de imersão (1.000x) (Zimmer et al., 1999).

Os esfregaços foram classificados em negativos ou positivos de acordo com a presença ou ausência de BAAR característicos (Aduriz, 1993): negativo - ausência de BAAR compatíveis com *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; e positivo - presença de BAAR de morfologia atípica ou de grande quantidade de BAAR de forma isolada ou presença de agregados de BAAR compatíveis com *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Das mesmas amostras fez-se a cultura microbiológica de acordo com os métodos descritos por Juste et al. (1991) e por Aduriz et al. (1995) (dados não publicados).

A análise de dados foi efetuada com recurso do programa SPSS 10.0^{®1} para Windows[®]. Para comparar a eficácia das técnicas nas diferentes amostras, usou-se o coeficiente *kappa* (κ) de Choen, que mediu a concordância proporcional não aleatória entre duas provas (Altman, 1991)

¹ SPSS Inc. (Chicago III, 2000) - Chicago, EUA.

sobre os resultados obtidos nas diferentes provas laboratoriais. Um valor de κ de 0,5 indica moderado nível de acordo com as técnicas. Um valor de $\kappa > 0,80$ representa excelente concordância proporcional não aleatória. Para esse cálculo, foi utilizado o programa WinEpiscope 2.0[®].

RESULTADOS

Os resultados encontram-se na Tab.1. Dos 26 esfregaços fecais analisados, 16 (61,5%) mostraram BAAR compatíveis, sendo classificados como positivos (Fig. 1). Cinquenta e seis esfregaços de tecidos, dos 104 analisados, apresentaram BAAR compatíveis com *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. A utilização simultânea do método em amostras de fezes e tecidos apresentou melhor valor diagnóstico, classificando 21 animais como positivos (80,8%). O esfregaço de fezes revelou-se como o método com mais baixa sensibilidade (61,5%), detectando o menor número de amostras positivas. A cultura microbiológica de tecidos isolou o agente em cinco animais positivos em simultâneo no método de Ziehl-Neelsen em tecidos e fezes. A cultura microbiológica de fezes isolou *M. avium* subsp. *paratuberculosis* em um animal que também foi simultaneamente positivo ao método de Ziehl-Neelsen em tecidos

e fezes. As estirpes de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isoladas em cultura foram analisadas por uma técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) combinada com endonucleases de restrição (PCR-REA) no Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrário – NEIKER (Bizcaia, Espanha). A análise identificou as estirpes como pertencentes ao tipo S (ovino) (dados não publicados).

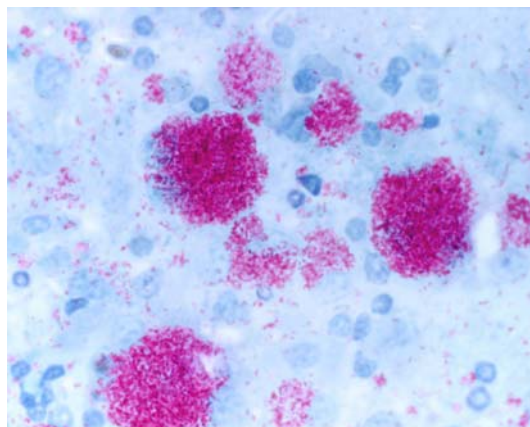


Fig.1. Bacilos álcool-ácido resistentes compatíveis com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em esfregaço de tecidos (Ziehl-Neelsen, 1000x).

Tabela 1. Resultado dos esfregaços de fezes e tecidos de 26 animais confirmados como paratuberculosos

Resultado	Esfregaço de fezes		Esfregaço de tecidos		Esfregaço de fezes e tecidos	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	16	61,5	20	76,9	21	80,8
Negativo	10	38,5	6	23,1	5	19,2
Sensibilidade (%)		61,5		76,9		80,8

A partir das amostras de intestinos e gânglios, 20 animais (76,9%) foram classificados pelo método de Ziehl-Neelsen como positivos e seis como negativos (23,1%). A técnica revelou o maior número de amostras positivas no esfregaço de válvula ileocecal, classificando 17 (65,4%) dos 26 esfregaços como positivos. A partir do gânglio mesentérico, encontraram-se 14 (53,8%) resultados positivos. O íleo foi positivo em igual número de amostras e o jejuno apresentou percentagem de positividade de 42,3%. Observou-se positividade simultânea nas quatro amostras de tecidos em oito (30,8%) animais. Três (11,5%) animais apresentaram resultados positivos em três amostras de tecidos, seis

(23,1%) em duas e três (11,5%) apenas em uma amostra. Os resultados do método em tecidos encontram-se na Tab. 2.

Tabela 2. Positividade para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nas diferentes amostras de tecidos pelo método de Ziehl-Neelsen

Tecido	Positivos	%
Íleo	14	53,8
Jejuno	11	42,3
Válvula ileocecal	17	65,4
Gânglio mesentérico	14	53,8
Total	56	53,8

Na Tab. 3, encontram-se a percentagem de concordância e o resultado do índice *kappa*, para a comparação do método de Ziehl-Neelsen nos dois tipos de amostras. Em 15 animais, os resultados do esfregaço fecal e de tecidos foi coincidente. É ainda possível observar que o esfregaço fecal de um animal apresentava bacilos compatíveis que não foram observados no

esfregaço de tecidos. De forma inversa, houve cinco animais com resultado positivo no Ziehl-Neelsen nos tecidos nos quais não se conseguiu observar bacilos compatíveis nas fezes. A concordância observada foi de 76,9%, e o resultado do índice de κ igual a 0,47. Um valor de κ entre 0,41 e 0,60 representa uma concordância moderada (Altman, 1991).

Tabela 3. Comparação entre o resultado do método de Ziehl-Neelsen nas fezes e o método de Ziehl-Neelsen nos tecidos

Método de Ziehl-Neelsen nas fezes	Método de Ziehl-Neelsen nos tecidos		
	+	-	Total
+	15	1	16
-	5	5	10
Total	20	6	26

Concordância observada: 76,9%; valor de κ : 0,47.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da paratuberculose em ovinos é particularmente difícil. Não existe um teste de referência que permita a detecção de todos os animais infectados. Tradicionalmente, recorre-se a testes serológicos combinados com exames clínico, bacteriológico das fezes (Hilbink et al., 1994; Clarke, 1997; Pavlik et al., 2000) e à histopatologia (Pérez et al., 1997). Recentemente, tem-se assistido a um incremento das técnicas de biologia molecular no diagnóstico da paratuberculose para solucionar o problema do diagnóstico (McKenna et al., 2005; Sivakumar et al., 2005). Contudo, comparativamente ao método de Ziehl-Neelsen, essas técnicas, dispendiosas e morosas, requerem pessoal especializado. O Ziehl-Neelsen é rápido, barato e permite uma primeira abordagem diagnóstica que não deve ser descartada, estando ao alcance de qualquer laboratório (Juste e Aduriz, 1990).

O exame microscópico por meio da coloração de Ziehl-Neelsen dos esfregaços fecais e de tecidos é uma forma rápida e econômica de obter o diagnóstico, dependendo da presença de agregados de BAAR, que podem ser excretadas de forma intermitente. A presença de BAAR isolados, de origem ambiental, é relativamente comum, o que torna o diagnóstico difícil devido à baixa especificidade da técnica (Juste e Aduriz, 1990). A visualização dos bacilos em esfregaços de fezes e de tecidos é uma prova rápida e sensível que oferece bons resultados em ovinos. Nos casos mais avançados, não suscita nenhuma

dúvida, quando as micobactérias adotam uma associação característica de grumos, devido à manutenção da estrutura que tinham no interior dos macrófagos (Juste e Aduriz, 1990), embora, nos casos em que a carga bacteriana é baixa, seja possível não serem detectados bacilos no exame microscópico, o que poderia explicar os resultados negativos à coloração de Ziehl-Neelsen e positivos em outras técnicas. Apesar da limitação do tamanho da amostra, a sensibilidade apresentada de forma individual e em combinação pelo método de Ziehl-Neelsen nos esfregaços de fezes e tecidos foi elevada, maior que o valor de 36,4% observado em fezes por Zimmer et al. (1999), em um estudo efetuado em bovinos infetados.

De acordo com Juste e Aduriz (1990), os esfregaços fecais podem identificar aproximadamente 33% das ovelhas clinicamente infectadas e 57% das ovelhas com lesões histopatológicas compatíveis. Confeccionar o esfregaço fecal parece apresentar mais vantagens nos ovinos que nos bovinos, devido à menor frequência com que nas fezes ovinas aparecem micobactérias saprófitas de características similares a *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, que podem induzir a falsas qualificações positivas (Juste e Aduriz, 1990). Neste estudo, verificou-se superioridade da coloração de Ziehl-Neelsen para o diagnóstico da infecção na válvula ileocecal. As preparações desse tecido propiciaram o maior número de resultados positivos.

Comparando os resultados obtidos no exame microscópico de fezes e tecidos pelo método de Ziehl-Neelsen, observaram-se diferenças que podem ser explicadas de várias formas. A ocorrência de uma amostra positiva no esfregaço das fezes, e negativa no esfregaço dos tecidos, poderá revelar inespecificidade do exame microscópico (Juste e Aduriz, 1990). Poderá também ser explicada pela raspagem para a impressão ter sido efetuada no local inadequado devido à coleta incorreta de fragmentos da lesão a cultivar, no caso de lesões difusas (Garrido, 2002).

A observação de bactérias compatíveis nos tecidos, mas não nas fezes, pode ser atribuída à excreção intermitente de pequenas quantidades de microrganismos nas fezes (Pavlik et al., 2000) ou porque a carga bacteriana é maior nos tecidos que nas fezes, facilitando a observação de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* a partir desse material (Huda e Jensen, 2003). Como *M. avium* subsp. *paratuberculosis* não se encontra distribuído de forma homogênea nas fezes, os resultados do esfregaço fecal podem variar, especialmente nos fracos excretadores (Visser, 1999).

Embora 19,2% dos animais não tivessem sido detectados pelo método de Ziehl-Neelsen e apesar do tamanho da amostra ser reduzido, os resultados desta investigação reforçam a importância do exame microscópico rápido em ovinos com sintomatologia compatível com a doença, como uma primeira técnica diagnóstica de fácil execução. Deve ser usado como método rotineiro de diagnóstico independentemente da utilização de outras técnicas microbiológicas. Estes resultados reforçam, ainda, a necessidade de usar a técnica de Ziehl-Neelsen como método de confirmação rápida dos casos clínicos submetidos à necropsia (Aduriz, 1993).

O esfregaço fecal é um exame ao alcance do médico veterinário que poderá fazer uma primeira observação do animal, em condições de campo, nas fases terminais da doença. Por outro lado, em combinação com esfregaço de tecidos durante a realização das técnicas anátomopatológicas, assume grande valor diagnóstico da infecção no rebanho.

Os resultados desse estudo demonstram que o procedimento de Ziehl-Neelsen é indicado para o

diagnóstico rápido de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* presente nas fezes e tecidos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Doutor Ramon Juste e a Iker Sevilla do Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrário, Bizcaya, Espanha, todo o apoio e colaboração neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÚRIZ, J.J.; JUSTE, R.A.; CORTABARRIA, N. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.*, v.45, p.211-217, 1995.

ADÚRIZ, J.J. *Epidemiologia, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco*. 1993. 283f. Tese (Doutorado) - Universidade de Zaragoza, Zaragoza.

ALTMAN, D.G. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman & Hall, 1991. p.611.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.*, v.74, p.218-262, 1984.

CLARKE, C.J. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.*, v.116, p.217-261, 1997.

COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.M.; DE LISLE, G.W. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.*, v.36, p.289-299, 1993.

EUROPEAN Commission (SANCO/B3/R16) Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis. Brussels: Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2000. p.76.

GARRIDO, J.M. *Puesta a punto de técnicas PCR en heces y de ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis. Estudio de prevalencia en ganado bovino*. 2002. 256f. Tese (Doutorado) - Universidade de Zaragoza, Zaragoza.

HILBINK, F.; WEST, D.M.; DE LISLE, G.W. et al. Comparison of a complement fixation test, a

- gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet. Microbiol.*, v.41, p.107-116, 1994.
- HUDA, A.; JENSEN, H.E. Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Comp. Pathol.*, v.129, p.259-267, 2003.
- JUSTE, R.A.; ADURIZ, J.J. Diagnostico. *Ovis*, v.7, p.49-62, 1990.
- JUSTE, R.A.; MARCO, J.C.; SÁEZ DE OCÁRIZ, C. et al. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, v.28, p.385-390, 1991.
- KALIS, C.H.J.; COLLINS, M.T.; BARKEMA, H.W. et al. Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Prev. Vet. Med.*, v.65, p.189-204, 2004.
- KIM, S.C.; KANG, S.I.; KIM, D.W. et al. Development and evaluation of an automated stainer for acid-fast bacilli. *Med. Engin. Physics*, v.25, p.341-347, 2003.
- McKENNA, S.L.B.; KEEFE, G.P.; BARKEMA, H.W. et al. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and faecal culture as comparison standards. *Vet. Microbiol.*, v.110, p.105-111, 2005.
- PAVLIK, I.; MATLOVA, L.; BARTL, J. et al. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet. Microbiol.*, v.77, p.309-324, 2000.
- PEREZ, V.; TELLECHEA, J.; BADIOLA, J.J. et al. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.58, p.799-803, 1997.
- SIVAKUMAR, P.; TRIPATHI, B.N.; SINGH, N. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalis bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet. Microbiol.*, v.108, p.263-270, 2005.
- STEINGART, K.R.; HENRY, M.; NG, V. et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.*, v.6, p.570-581, 2006.
- STEWART, D.J.; VAUGHAN, J.A.; STILES, P.L. et al. A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol.*, v.104, p.165-178, 2004.
- TANSUPHASIRI, U.; KLADPHUANG, B. Evaluation of sputum staining by modified cold method and comparison with Ziehl-Neelsen and fluorochrome methods for the primary diagnosis of tuberculosis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v.33, p.128-135, 2002.
- VAUGHAN, J.A.; LENGHAUSB, C.; STEWART, D.J. et al. Development of a Johne's disease infection model in laboratory rabbits following oral administration of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, v.105, p.207-213, 2005.
- VISSER, I. Reproducibility of a faecal culture method for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: MANNING, E.J.B.; COLLINS, M.Y. (Eds). Melbourne: Australia: Proc. VI Int. Coll. PTBC, 1999. p.512.
- ZIMMER, K.; DRÄGER, K.G.; KLAWONN, W. et al. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe® test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *J. Vet. Med. B*, v.46, p.137-140, 1999.