

PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA NO DIAGNÓSTICO DO *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* NA LINFADENITE CASEOSA CAPRINA

M.G. Ribeiro¹, J.G. Dias Junior¹, A.C. Paes¹, P.G. Barbosa², G. Nardi Júnior¹, F.J.P. Listoni¹

¹Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, CP 560, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: mgribeiro@fmvz.unesp.br

RESUMO

Procedeu-se a citologia aspirativa com agulha fina em onze caprinos com aumento de linfonodos submandibulares, parotídeos e pré-escapulares. Do material aspirado dos linfonodos foi possível o isolamento microbiológico e a identificação citológica do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em sete animais. O presente estudo pretendeu investigar a utilização da citologia aspirativa com agulha fina no diagnóstico citológico e microbiológico da linfadenite caseosa caprina.

PALAVRAS-CHAVE: Linfadenite caseosa caprina, diagnóstico, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, biópsia por citologia aspirativa.

ABSTRACT

THIN NEEDLE ASPIRATION IN DIAGNOSIS OF *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* FROM CASEOUS LYMPHADENITIS IN GOATS. Thin needle aspiration in eleven goats with enlargement of peripheral lymph nodes was evaluated. In seven out of eleven goats the *Corynebacterium pseudotuberculosis* was identified by cytology and isolated from material collected by thin needle aspiration. The purpose of this study is to describe the utilization of thin needle aspiration in the cytologic and microbiologic diagnosis of caseous lymphadenitis in goats.

KEY WORDS: Caseous lymphadenitis, goats, diagnosis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, thin needle aspiration biopsy.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade desenvolvida em todo território nacional, porém com maior concentração nas regiões semi-áridas dos Estados Nordestinos (RIBEIRO, 1988a). Nos últimos anos, a criação da espécie vem sendo incrementada em outras regiões do país, como alternativa nutricional de populações de baixa renda, visando o consumo da carne, e principalmente do leite caprino (BARCELLOS *et al.*, 1987), bem como a fabricação de queijos finos (GUIMARÃES *et al.*, 1989), ou como sucedâneo lácteo para pacientes com intolerância ao leite bovino (STHELING & SOUZA, 1987).

Diferentes fatores sanitários são indicados como responsáveis pela redução da produtividade caprina, dentre os quais pode ser destacada a linfadenite caseosa - também denominada "mal do caroço" (RIBEIRO, 1988a), em virtude dos prejuízos provocados com a queda na produção de leite, além do comprometimento da pele e carcaça (RIBEIRO, 1988b).

A linfadenite caseosa caprina é reconhecida como doença crônica em caprinos e ovinos, causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*), caracterizada pela formação de abscessos, principalmente em linfonodos superficiais. Comumente são afetados os linfonodos submaxilares, pré-escapulares, pré-femorais, supramamários e poplíteos, embora o agente também esteja associado a casos de mastite, pneumonia crônica, linfadenite mesentérica e pielonefrite, bem como o desenvolvimento de abscessos subcutâneos e/ou em órgãos internos (UNANIAN *et al.*, 1985; BROWN *et al.*, 1987; RADOSTITIS *et al.*, 1994).

A fonte de infecção para os animais é freqüentemente relacionada a eliminação do *C. pseudotuberculosis* pelo material purulento de linfonodos abscedados, ou descargas oro-nasais de animais com pneumonia. O agente pode ser veiculado a outros caprinos por contato direto com animais com infecção pulmonar. Paralelamente, a contamina-

²Zootecnista, Pós-Graduanda em Nutrição e Produção Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP

ção do ambiente, água e alimentos com o material purulento de linfonodos, pode gerar a formação de aerossóis, ou promover a infecção via oro-nasal por soluções de continuidade da pele, em especial causadas por lesões perfurantes do tecido subcutâneo (CORRÊA & CORRÊA, 1992), ou mesmo por abrasões causadas na região do pescoço, em instalações providas de canzil.

A infecção do homem com o *C. pseudotuberculosis* é considerada ocasional, caracterizada como zoonose ocupacional de caprino e ovinocultores, bem como de profissionais ligados à criação destas espécies. A transmissão do agente para o homem pode ocorrer pelo contato manual com material purulento procedente de abscessos de pele, linfonodos abscedados, e ocasionalmente, pela ingestão do leite de animais com mastite (RADOSTITIS *et al.*, 1994).

LANGENEGGER & LANGENEGGER (1991) referem diferentes técnicas indiretas propostas ao longo dos anos para o diagnóstico da linfadenite caseosa caprina, entre as quais testes sorológicos (soroneutralização para anti-toxinas do *C. pseudotuberculosis*, imunodifusão em gel de ágar, hemaglutinação indireta, fixação de complemento, ELISA) e de imunidade mediada por células, a partir de testes alérgicos. Em virtude das divergências dos resultados dos testes indiretos no diagnóstico da linfadenite caseosa caprina (LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1991), e do envolvimento de outros agentes na ocorrência da linfadenite caseosa, incluindo *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) e *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* (RADOSTITIS *et al.*, 1994), o isolamento direto do *C. pseudotuberculosis* a partir do material purulento de linfonodos permanece como um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico "in vivo".

Nos últimos anos, diferentes técnicas vem sendo utilizadas como alternativas de diagnóstico em medicina veterinária, entre elas a citologia. A partir de 1980, tem sido crescente o emprego da citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) no diagnóstico anátomo-patológico em medicina veterinária, com referência especial a neoplasias (TUDURY *et al.*, 1992; BRACARENSE *et al.*, 1993; ROCHA, 1998). GUEDES *et al.* (1997) afirmam que a CAAF apresenta como vantagens o baixo custo, simplicidade de execução, reduzida agressão no local de aspiração tecidual, e possibilidade de diagnóstico citológico acurado em curto espaço de tempo, se comparado à outros métodos, como a histopatologia.

Recentemente, DOMINGUES (1999) utilizou a CAAF pela primeira vez no Brasil visando o diagnóstico citológico da mastite bovina subclínica, enquanto RIBEIRO *et al.* (1999) empregaram pioneiramente a

mesma metodologia no país, para o diagnóstico citológico de mastite clínica bovina por *Prototheca zopfii* (*P. zopfii*), além de obterem o isolamento do agente e identificação por microscopia eletrônica de varredura, a partir do material aspirado da glândula mamária.

Considerando a necessidade de isolamento e identificação dos microrganismos envolvidos na ocorrência da linfadenite caseosa caprina, para a instituição de medidas de controle e tratamento, o presente estudo pretendeu avaliar o emprego da punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico citológico e microbiológico do *C. pseudotuberculosis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas nove cabras adultas e dois cabritos da raça Saanem que apresentavam aumento de linfonodos, principalmente em região de cabeça (parotídeos, submandibulares e pré-escapular) (Fig. 1), em propriedade localizada na região de Jau, SP. As nove cabras situavam-se em um mesmo capril, em diferentes baias, enquanto os dois cabritos eram mantidos em outro capril, na mesma propriedade, distante dos demais animais adultos.

Procedeu-se a CAAF (GUEDES *et al.*, 1997; ROCHA, 1998; DOMINGUES, 1999), em duplicata, de oito linfonodos parotídeos, dois submandibulares e um pré-escapular dos onze diferentes caprinos com aumento de linfonodos, utilizando-se o citoaspirador de Valeri®, agulhas hipodérmicas (30x7mm), seringas descartáveis e individuais para cada colheita (Fig. 2). O primeiro material colhido de cada linfonodo pela CAAF, contido tanto na agulha quanto na seringa, foi acondicionado sob refrigeração, e encaminhado para isolamento e identificação microbiológica no Laboratório de Enfermidades Infecciosas da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

O material aspirado dos linfonodos foi depositado em tubos contendo caldo cérebro-coração, e incubado por 12 horas em condições de aero e microaerofilia, a 37°C, para posterior cultivo microbiológico nos meios de ágar sangue ovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, após a constatação de turvação do caldo. Os meios de ágar MacConkey e ágar sangue foram mantidos, respectivamente, por 48 horas e 96 horas, para identificação dos microrganismos isolados segundo suas características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (KRIEG & HOLT, 1994; QUINN *et al.*, 1994), incluindo o teste de CAMP frente a cepa de *Rhodococcus equi* (*R. equi*), para o diagnóstico diferencial do *C. pseudotuberculosis*.

Material fecal de todos os animais acometidos, bem como proveniente do canzil, ração e bebedouro das instalações com animais apresentando linfadenite foram colhidos e semeados nos meios de ágar sangue e MacConkey, nas mesmas condições supracitadas.

O segundo material citológico obtido de cada linfonodo dos onze animais, foi imediatamente distendido em quatro lâminas de microscopia, de extremidade fosca, das quais duas foram submetidas posteriormente às colorações de Gram e Giemsa.

Todos os microrganismos identificados como *C. pseudotuberculosis* foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana (BAUER *et al.*, 1966), frente a amicacina (30mcg), amoxicilina/ácido clavulânico (30mcg), ampicilina (10mcg), ceftiofur (30mcg), ciprofloxacina (5mcg), cloranfenicol (30mcg), enrofloxacina (5mcg), estreptomina (10mcg), florfenicol (30mcg), gentamicina (10mcg), norfloxacina (10mcg), penicilina G (10 unidades), rifampicina (5mcg), sulfadiazina/trimetoprim (25mcg), tetraciclina (30mcg) e vancomicina (30mcg).

RESULTADOS

Em seis linfonodos parotídeos (quatro cabras e dois cabritos) e em um sub-mandibular (cabra adulta) dos 11 linfonodos aspirados, obteve-se no meio de ágar sangue, a partir de 48 a 72 h de cultivo, o isolamento de colônias diminutas (aproximadamente 0,5 mm de diâmetro), esbranquiçadas, ressecadas, com hemólise nítida a partir de 48 horas (Fig. 3). A análise das características morfo-tintoriais pela coloração de Gram revelou microrganismos gram-positivos, pleomórficos, tendendo a formas cocóides. Com base nestas características, associadas às bioquímicas e de cultivo, incluindo o teste de CAMP utilizando o *Rhodococcus equi* (Fig. 4), identificou-se o agente como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Nos demais linfonodos aspirados dos quatro animais restantes, obteve-se no meio de ágar-sangue, a partir de 24 h, o isolamento de *P. multocida* em três animais e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) em um animal. Não verificou-se isolamento de nenhum microrganismo no meio de MacConkey.

As sete cepas de *C. pseudotuberculosis* isoladas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados "in vitro", com exceção da amicacina e estreptomina, as quais todas as cepas do agente se mostraram resistentes.

A partir do material fecal de todos os animais acometidos, bem como do canzil, água e ração não foi possível o isolamento do *C. pseudotuberculosis*.

Utilizando-se as colorações de Gram e/ou Giemsa foi possível a identificação de organismos gram-positivos, cocóides, semelhantes às formas descritas para o *C. pseudotuberculosis* em todos aspirados citológicos

dos linfonodos (Figs. 5 e 6) provenientes dos sete animais onde o agente foi identificado microbiologicamente. No material citológico dos outros animais observou-se à citologia a presença de cocos gram-negativos em três linfonodos, e no restante, microrganismos gram-positivos em forma de cocos, diplococos ou cocos agrupados, compatíveis, respectivamente, com os isolamentos de *P. multocida* e *S. aureus*.

DISCUSSÃO

Em anos recentes, vários estudos têm empregado a CAAF no diagnóstico de diferentes afecções em medicina veterinária (TUDURY *et al.*, 1992; BRACARENSE *et al.*, 1993; ROCHA, 1998). RIBEIRO *et al.* (1999) utilizando a técnica de CAAF em fêmea bovina com mastite clínica por *P. zopfii* também obtiveram êxito na identificação citológica, bem como o isolamento dessa alga a partir de material aspirado citologicamente. No presente estudo, o emprego da CAAF também permitiu o isolamento do *C. pseudotuberculosis* em sete linfonodos de animais distintos, concomitante à identificação citológica (colorações de Gram e/ou Giemsa) de microrganismos com as mesmas características morfológicas dos obtidos dos mesmos animais dos quais o agente foi diagnosticado microbiologicamente.

As duas técnicas tintoriais prestaram-se à identificação citológica do organismo. Apesar da coloração de Gram não possuir indicação primária para tecidos, ao contrário da coloração de Giemsa, no presente estudo, a tonalidade azulada assumida pelo *C. pseudotuberculosis* (reconhecidamente gram-positivo), em contraste com a coloração avermelhada do restante do material celular e inflamatório advindo dos linfonodos aspirados, favoreceram a individualização do agente pelo método de Gram.

O emprego da CAAF no diagnóstico da linfadenite caseosa caprina por *C. pseudotuberculosis* no presente estudo, demonstrou-se de fácil execução, de baixo custo e de reduzida agressão tecidual se comparado a outras técnicas convencionais, como a histopatologia. A CAAF possibilitou diagnóstico citológico presuntivo do agente, antes da abscedação dos linfonodos acometidos, permitindo conseqüentemente, a adoção precoce de medidas profiláticas e terapêuticas para os animais com linfadenite e para o restante do rebanho. Adicionalmente, a possibilidade de isolamento microbiológico dos microrganismos envolvidos na linfadenite caseosa caprina (a partir do material aspirado pela CAAF), permitiu o diagnóstico definitivo da etiologia da doença, bem como o diferencial para outros agentes, incluindo a *P. multocida* e *S. aureus*, também referidos na gênese dos processos de linfadenites e abscessos na espécie caprina (RADOSTITIS *et al.*, 1994).



Fig. 1 - Linfadenite submandibular por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em fêmea caprina da raça Saanem.



Fig. 2 - Citologia aspirativa com agulha fina em fêmea caprina com linfadenite caseosa.



Fig. 3 - Efeito hemolítico de colônias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, em cultivo de 48 horas, no meio de ágar-sangue ovino.

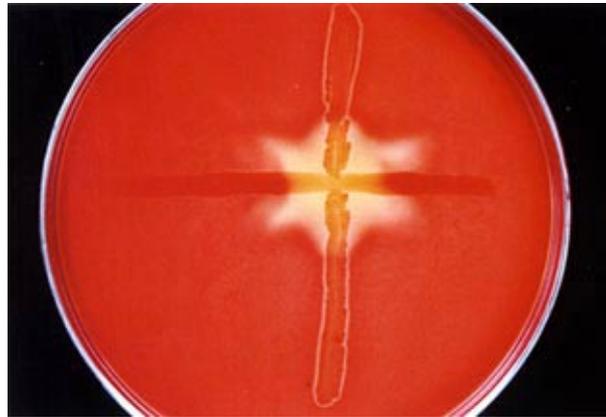


Fig. 4 - Teste de CAMP, demonstrando efeito hemolítico sinérgico em cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (vertical) e *Rhodococcus equi* (horizontal).

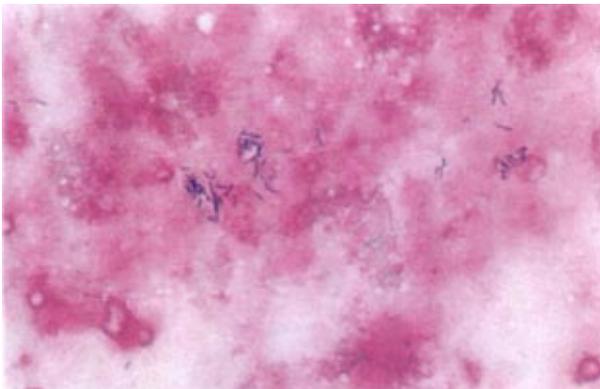


Fig. 5 - Citologia de linfonodo caprino, demonstrando aspecto pleomórfico do *Corynebacterium pseudotuberculosis*, corado pelo método de Gram (400X).

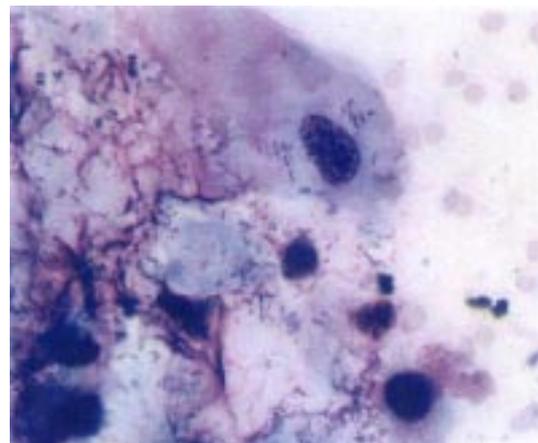


Fig. 6 - Citologia de caprino com linfadenite, demonstrando localização intracitoplasmática do *Corynebacterium pseudotuberculosis*, corado pelo método de Giemsa, em células de linfonodo parotídeo (400X).

Apesar do *C. pseudotuberculosis* promover a infecção por contaminação ambiental de alimentos, água ou fômites, além do contato direto via respiratória, não foi possível o isolamento do agente das fezes dos animais acometidos, bem como do canzil, água ou ração das instalações, corroborando RADOSTITIS *et al.* (1994), que referem a dificuldade do isolamento fecal e/ou ambiental do agente.

Ainda que quase a totalidade das cepas de *C. pseudotuberculosis* tenham demonstrado sensibilidade "in vitro" aos antimicrobianos testados, optou-se por indicar o isolamento dos animais acometidos, e a terapia com a associação entre a rifampicina (10mg/kg/24h/V.O./20 dias) e o florfenicol (20mg/kg/48h/I.M./5 dias). Este procedimento terapêutico encontra justificativa na alta capacidade de penetração celular da primeira droga (TAVARES, 1996), recomendável para a terapia de agentes intracelulares facultativos, como o *C. pseudotuberculosis* (RADOSTITIS *et al.*, 1994), associado a administração parenteral da segunda droga, buscando atingir índices terapêuticos nos primeiros dias de terapia, face a inapetência constatada em alguns animais. Paralelamente à terapia antimicrobiana, foram indicadas medidas profiláticas visando o controle da introdução de novos animais, desinfecção ambiental, bem como a utilização de vacina comercial em todo o plantel, em virtude da ocorrência da linfadenite em animais de diferentes faixas etárias, localizados em instalações distintas na propriedade.

Perante os resultados, sugere-se a utilização da CAAF como método alternativo no diagnóstico da linfadenite caseosa caprina. Dentre a literatura consultada, infere-se pela primeira vez no país, a utilização da CAAF no diagnóstico citológico associado ao isolamento do *C. pseudotuberculosis* do material aspirado, em casos de linfadenite caseosa caprina. Estes resultados sugerem a utilização da CAAF como método alternativo de diagnóstico da doença, considerada de grande impacto na exploração da espécie, decorrente dos prejuízos provocados na produção de carne, leite e na comercialização da pele, bem como sua importância em saúde pública, pelo potencial zoonótico do agente.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Ass. Dra. Noeme Souza Rocha e ao Prof. Ass. Dr. Paulo Francisco Domingues - FMVZ - UNESP/Botucatu, SP, pelas orientações técnicas na realização da citologia, e a Fundação para o Desenvolvimento da UNESP - FUNDUNESP, pelo suporte financeiro na aquisição do citoaspirador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELLOS, T.F.S.; SILVA, N.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Mamite caprina em rebanhos próximos à Belo Horizonte-Minas Gerais. I-Etiologia e sensibilidade a antibióticos. II-Métodos de diagnóstico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 39, p.307-315, 1987.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493-496, 1966.
- BRACARENSE, A.P.F.R.L.; REIS, A.C.F.; VIOTTI, N.M.A. Estudo comparativo entre o exame citológico e histopatológico nas neoplasias dos animais domésticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 15., 1993, Rio de Janeiro, RJ. *Resumos*. Rio de Janeiro: 1993. p.139.
- BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; ALVES, S.F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. *Can. J. Vet. Res.*, v.51, p.46-49, 1987.
- CORRÊA, W.M. & CORRÊA, C.N.M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.147-149.
- DOMINGUES, P.F. *Estudo de parâmetros de constituintes do leite e plasma sanguíneo, possível associação do polimorfismo genético-bioquímico das beta-globulinas e transferrinas e exame citológico nas mastites bovinas subclínicas*. Botucatu: 1999. 121p. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP-Botucatu].
- GUEDES, R.C.M.; NOGUEIRA, R.H.G.; TUDURY, E.A. Diagnóstico citológico de lesões proliferativas e inflamatórias através da técnica de punção de tecidos com agulha fina. *Hora Vet.*, n.96, p.15-21, 1997.
- GUIMARÃES, M.P.M.P.; CLEMENTE, W.T.; SANTOS, E.C.; RODRIGUES, R. Caracterização de alguns componentes celulares e físico-químicos do leite para diagnóstico da mamite caprina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.41, p.129-142, 1989.
- KRIEG, N.R. & HOLT, J.C. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 984p.
- LANGENEGGER, H. & LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.11, n.1/2, p.1-7, 1991.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe, 1994. p.137-143.
- RADOSTITIS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. *Veterinary medicine. a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 8.ed. London: Baillière Tindall, 1994. p.652-655.
- RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; ROCHA, N.S.; DOMINGUES, P.F.; RIBEIRO, A.R.; NARDI JÚNIOR, G. Citologia aspirativa com agulha fina e microscopia eletrônica de varredura no diagnóstico de mastite clínica bovina por *Prototheca zopfii*. *Rev. Núcleo Apoio Pesq. Glândula Mamária Prod. Leiteira*, v.2, n.5, p.15-20, 1999.
- RIBEIRO, O.C.; SILVA, J.A.H.; MAIA, P.C.C.; CAMPOS, W.G. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.8, n.1/2, p.27-29, 1988b.

- RIBEIRO, O.C.; SILVA, J.A.H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.10, n.2, p.23-24, 1988a.
- ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulhas finas (CAAF). *Rev. Cães e Gatos*, v.13, n.79, p.14-16, 1998.
- STHELING, J.M. & SOUZA, M.H. Leite de cabras: aspectos nutricionais e de mercado. *Inf. Agropec.*, Belo Horizonte, v.13, p.54-55, 1987.
- TAVARES, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 792p.
- TUDURY, E.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; GIRALDI, J.H.; BAHR, M.V. Metástase cerebral de tumor venéreo transmissível em cão. *Rev. Cães e Gatos*, n.40, p.27-28, 1992.
- UNANIAN, M.M.; FELICIANO SILVA, A.E.; PANT, K.P. Abscess and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. *Trop. Anim. Health and Prod.*, v.17, p.52-62, 1985.

Recebido para publicação em 18/7/00