



EUGENIA MÁRCIA DE DEUS OLIVEIRA

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300001474

AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ESTIRPES DE *Mycobacterium avium* PRESENTES NA POPULAÇÃO DE SUÍNOS NO SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

T.1051
FMVZ
ex.2

São Paulo
2001

EUGENIA MÁRCIA DE DEUS OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ESTIRPES DE *Mycobacterium avium* PRESENTES NA POPULAÇÃO DE SUÍNOS NO SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

ID: 1102

N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 2051
FmVZ
e: 2
N.º TOMBO
021365

545W01 J23J296

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

Acervo - FMVZ 021365



São Paulo
2001

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

Oliveira, Eugenia Márcia de Deus

Avaliação da virulência de estirpes de *Mycobacterium avium* presentes na população de suínos no sul do Brasil / Eugenia Márcia de Deus Oliveira.

65 f. : il.

Dissertação (mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2001.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

Unitermos: 1.Complexo *Mycobacterium avium*.
2.Suínos. 3.Micobacteriose. 4.Virulência.
5.Tuberculose.

Dedico

À memória de minha mãe Analha

*Exemplo de mulher
que me ensinou
Os verdadeiros valores
da vida*

*“Toda saudade é a
presença da ausência de alguém,
de algum lugar, de algo enfim...
Toda saudade é um capuz transparente
que veda e ao mesmo tempo traz a visão,
o que não pode ser porque se deixou para trás,
mas que guardou no coração”*

Gilberto Gil

*“Eu apenas queria que você soubesse que aquela criança ainda está comigo,
e que a minha ternura não ficou no tempo presa na poeira. Eu apenas queria
dizer a todo mundo que me gosta que hoje eu tenho muito mais, porque te
entendo muito mais também e que a atitude de recomeçar é todo dia, toda
hora”*

Gonzaguinha

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos pelos ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e, principalmente, por ter-me acenado a possibilidade de superar as limitações e conquistar novos horizontes.

*“Se és capaz de aceitar
seus alunos como são em sua realidade social, humana e
cultural; se os leva a superar suas dificuldades, limitações ou
fracassos, sem humilhações, sem inúteis frustrações; se os
estimula a emitir opiniões, mesmo contrárias às suas; se os
leva a refletir mais do que decorar; se te emocionas com a
visão de tantas criaturas que de ti dependem para
desabrocharem em consciência, criatividade, liberdade e
responsabilidade, então podes dizer: Sou Mestre.”*

Rui Barbosa

Agradecimentos

Como dizer “obrigada” quando há tantos a quem agradecer?

À minha família, pelo incentivo por esta conquista, apesar da distância.

À Antonio César pelo seu amor, companheirismo e cumplicidade.

À prof^a. Simone Assis Rosas de Aquino Viegas e ao Prof. Edgard de Aquino Viegas (in memoriam) que me transmitiram seus conhecimentos e experiências profissionais e de vida com dedicação e carinho; que me guiaram para além das teorias, das filosofias e das técnicas, expresse os meus maiores agradecimentos e o meu profundo respeito, que sempre serão poucos, diante do muito que me foi oferecido.

À Zenaide Maria de Moraes pela ajuda permanente e imprescindível durante todas as etapas do projeto, amizade e valiosos ensinamentos, meu reconhecimento e profunda gratidão.

À Rosana Tabata, amiga, camarada, minha eterna gratidão por tudo que significa e representa para mim.

À Gisele Oliveira de Souza e Orlando Bispo de Souza que procuraram na amizade dar sua parcela de contribuição nessa jornada.

À técnica de laboratório Gisele Dias e Dona Odete pela eficiência no preparo de materiais para realização dos experimentos.

À Antonio da Costa Martins pela ajuda durante a manutenção dos hamsters no biotério.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação, pelo aprendizado e experiências.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia Cardoso Leão pela orientação e preparo do desafio.

À Prof^a. Dr^a. Simone de Carvalho Balian pelos ensinamentos e orientações técnicas envolvidas neste estudo.

Ao Prof. Dr. José Luis Guerra, pela leitura das lâminas do histopatológico.

Aos Funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, pela colaboração constante.

À Ricardo Augusto Dias pela amizade e auxílio imprescindível na análise estatística.

Aos colegas de pós-graduação, em especial aos amigos Fábio Gregori, Paulo Brandão, César Alejandro, Adriana Cortez, Patrícia Pozzetti, Lara Borges, Rodrigo Soares, Sílvio Luis, Fernanda Marvullo, Jean Carlos e Sidnei M. sakamoto , companheiros desta jornada, todo meu respeito e minha verdadeira amizade.

À FAPESP, pelo incentivo financeiro.

A todos quantos, seja pela colaboração direta ou indireta, seja pelo incentivo, apoio ou amizade, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

“...Na cadeia da vida são todos os elos igualmente valiosos, porque todos são igualmente necessários...”

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

*A certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar...*

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura... um encontro...”

Fernando pessoa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Padrões de RFLP da família PIG-B e sua distribuição espacial por município - Brasil - 2001..... 25
- Figura 2** - Padrões de RFLP da família PIG-A e sua distribuição espacial por município - Brasil - 2001..... 25
- Figura 3** - Padrões de RFLP da família PIG-C e sua distribuição espacial por município - Brasil - 2001..... 26
- Figura 4** - Padrões de RFLP da família PIG-D e sua distribuição espacial por município - Brasil - 2001..... 26
- Figura 5** - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de hamster inoculado com a estirpe PIG-B aos dois dias pós-inoculação intra-peritoneal, mostrando granuloma específico. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento: 40X..... 34
- Figura 6** - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de hamster inoculado com a estirpe PIG-B aos 13 dias pós-inoculação intra-peritoneal, mostrando granuloma específico. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento: 100X..... 35
- Figura 7** - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de hamster inoculado com a estirpe PIG-B aos 26 dias pós-inoculação intra-peritoneal, mostrando granuloma específico. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento: 200X..... 36

Figura 8 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de hamster inoculado com a estirpe PIG-B aos 40 dias pós-inoculação intra-peritoneal, mostrando granuloma específico. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento: 40X..... 37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Número de animais sacrificados segundo os grupos e tempos experimentais - São Paulo - 2001..... 29
- Tabela 2** - Resultados das contagens de U.F.C. em órgãos de hamsters inoculados à dois dias pela via intra-peritoneal com quatro estirpes de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001..... 38
- Tabela 3** - Resultados das contagens de U.F.C. em órgãos de hamsters inoculados à 13 dias pela via intra-peritoneal com quatro estirpes de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001..... 39
- Tabela 4** - Resultados das contagens de U.F.C. em órgãos de hamsters inoculados à 26 dias pela via intra-peritoneal com quatro estirpes de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001..... 40
- Tabela 5** - Resultados das contagens de U.F.C. em órgãos de hamsters inoculados à 40 dias pela via intra-peritoneal com quatro estirpes de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001..... 41
- Tabela 6** - Valores de p* referentes à comparação das contagens de U.F.C. de *Mycobacterium avium* entre órgãos de hamsters experimentalmente infectados - São Paulo - 2001..... 50
- Tabela 7** - Valores de p* referentes à comparação das contagens de U.F.C. entre as quatro estirpes de *Mycobacterium avium*, segundo os tempos experimentais. Hamsters inoculados pela via intra-peritoneal - São Paulo - 2001..... 52

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Evolução das contagens de U.F.C. em fígado de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-A de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001..... 42
- Gráfico 2** - Evolução das contagens de U.F.C. em baço de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-A de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001..... 43
- Gráfico 3** - Evolução das contagens de U.F.C. em pulmão de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-A de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001..... 43
- Gráfico 4** - Evolução das contagens de U.F.C. em fígado de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-B de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001..... 44
- Gráfico 5** - Evolução das contagens de U.F.C. em baço de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-B de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001..... 45
- Gráfico 6** - Evolução das contagens de U.F.C. em pulmão de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-B de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001..... 45
- Gráfico 7** - Evolução das contagens de U.F.C. em fígado de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-C de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001..... 46
- Gráfico 8** - Evolução das contagens de U.F.C. em baço de hamster inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-C de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001..... 47

Gráfico 9 - Evolução das contagens de U.F.C. em pulmão de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-C de <i>Mycobacterium avium</i> - São Paulo - 2001.....	47
Gráfico 10 - Evolução das contagens de U.F.C. em fígado de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-D de <i>Mycobacterium avium</i> - São Paulo - 2001.....	48
Gráfico 11 - Evolução das contagens de U.F.C. em baço de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-D de <i>Mycobacterium avium</i> - São Paulo - 2001.....	49
Gráfico 12 - Evolução das contagens de U.F.C. em pulmão de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-D de <i>Mycobacterium avium</i> - São Paulo - 2001.....	49
Gráfico 13 - Número de U.F.C. de <i>Mycobacterium avium</i> segundo órgãos e tempos experimentais. Hamsters inoculados pela via intra-peritoneal - São Paulo - 2001.....	51
Gráfico 14 - Número de U.F.C. de <i>Mycobacterium avium</i> segundo estirpes e tempos experimentais. Hamsters inoculados pela via intra-peritoneal - São Paulo - 2001	53

LISTA DE ABREVIATURAS

7H9	Meio líquido de cultivo para micobactérias
7H10	Meio sólido de cultivo para micobactérias
AIDS	“Acquired Immunodeficiency Syndrome”
g	Grama
HIV	“Human Immunodeficiency virus”
IS	“Insertion sequence”
LO	Colônias lisas opacas
LT	Colônias lisas transparentes
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MOTT	Micobactérias outras que não as tuberculosas
mg	miligrama
mL	mililitro
μL	microlitro
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PRA	“PCR-Restriction Enzyme Analysis”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
RO	Colônias rugosas opacas
U.F.C.	Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

OLIVEIRA, E. M. D. **Avaliação da virulência de estirpes de *Mycobacterium avium* presentes na população de suínos no sul do Brasil.** [Evaluation of *Mycobacterium avium* strains virulence of from porcine population of south Brazil.] São Paulo, 2001. 65p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Tendo sido comprovada a existência de famílias molecularmente distintas de *M. avium* circulando em suínos da região sul do Brasil, e havendo dúvidas a respeito da importância da transmissão horizontal como mecanismo de manutenção da doença, o presente teve por objetivo estudar a virulência dessas estirpes, informação importante para o aperfeiçoamento dos métodos de controle. As estirpes emergiram do estudo caso-controle, onde as tipagens moleculares por RFLP mostraram a existência de quatro famílias de *M. avium* (PIG-A, B, C e D). Uma estirpe representante de cada família foi inoculada pela via intra-peritoneal em 48 hamsters com uma dose de 30.000 U.F.C. por animal. Após 2, 13, 26 e 40 dias da inoculação, 12 hamsters inoculados de cada família foram anestesiados, sacrificados e os agentes foram quantificados no fígado, baço e pulmão. A presença das estirpes foi verificada no sangue e também foram realizados exames histológicos. As estirpes PIG-A, B, C e D desenvolveram lesões granulomatosas no fígado e baço nos quatro tempos experimentais; disseminaram-se pela via linfo-hemática, multiplicando-se em fígado, baço e pulmão. Nos quatro tempos experimentais houve diferença entre as contagens de U.F.C./g entre os órgãos (T1: $p < 0,001$; T2: $p < 0,001$; T3: $p < 0,001$ e T4: $p < 0,001$) e as obtidas do baço foram sempre superiores às do fígado e pulmão. Nos quatro tempos experimentais houve diferença entre as contagens de U.F.C./g entre as estirpes (T1: $p < 0,001$; T2: $p < 0,001$; T3: $p < 0,001$ e T4: $p < 0,001$) e foi possível construir a seguinte escala decrescente de virulência: PIG-B > PIG-A > PIG-D > PIG-C.

Unitermos: Complexo *Mycobacterium avium*, virulência, suínos, micobacteriose, tuberculose.

ABSTRACT

OLIVEIRA, E. M. D. **Evaluation of *Mycobacterium avium* strains virulence from porcine population of south Brazil.** [Avaliação da virulência de estirpes de *Mycobacterium avium* presentes na população de suínos no sul do Brasil.] São Paulo, 2001. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Given that the existence of molecularly different families of *M. avium* circulating in swine of the south area of Brazil has been proved, and that some doubts remain regarding the importance of the horizontal transmission as mechanism of maintenance of the disease, this work aimed to study the virulence of those strains, an important information for the improvement of the control methods. The strains emerged from a case-control study, when the RFLP molecular typification showed the existence of four families of *M. avium* (PIG-A, B, C and D). A strain representative of each family was inoculated by intra-peritoneal route in 48 hamsters with a dose of 30.000 C.F.U./animal. After 2, 13, 26 and 40 days *post-infection*, 12 inoculated hamsters of each family were anesthetized, euthanized and the bacteria were quantified in the liver, spleen and lung. The presence of the strains was verified in the blood and also histological exams were accomplished. The strains PIG-A, B, C and D developed granulomatous lesions in the liver and spleen in the four experimental times; they were disseminated by the linfo-haematic route, multiplying in liver, spleen and lung. In the four experimental times there was difference among the countings of C.F.U./g among the organs (T1: $p < 0,001$; T2: $p < 0,001$; T3: $p < 0,001$ and T4: $p < 0,001$) and that obtained of the spleen were always superiors to the one of the liver and lung. In the four experimental times there was difference among the countings of C.F.U./g among the ancestries (T1: $p < 0,001$; T2: $p < 0,001$; T3: $p < 0,001$ and T4: $p < 0,001$) and was possible to build the following order of decreasing virulence: PIG-B > PIG-A > PIG-D > PIG-C.

Uniterms: *Mycobacterium avium* complex, virulence, swine, mycobacteriosis, tuberculosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	MATERIAL E MÉTODO	24
2.1	Animais	24
2.2	Agente Infectante	24
2.3	Preparo do Inóculo	27
2.4	Delineamento Experimental	29
2.5	Tratamento Estatístico	32
3	RESULTADOS	33
4	DISCUSSÃO	54
5	CONCLUSÕES	59
6	REFERÊNCIAS	60

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) são bacilos de crescimento lento que produzem pigmento amarelo na ausência de luz. MAC é composto por duas espécies, *M. avium* e *M. intracellulare*, classificadas sorologicamente em 28 sorovares. As micobactérias pertencentes aos sorovares 1 a 6, 8 a 11 e 21 representam o *M. avium*, as pertencentes aos sorovares 7, 12 a 20 e 25 representam o *M. intracellulare* (SAITO et al., 1990).

Acredita-se que os microrganismos pertencentes ao MAC sejam ubiqüitários, pois são freqüentemente isolados da água, plantas e solo, e estão distribuídos em toda parte do mundo. Antes da descoberta do HIV (vírus da imunodeficiência humana), o MAC era ocasionalmente responsável por infecções pulmonares localizadas em pessoas predispostas a doenças pulmonares obstrutivas, bronquiectasias e pneumonias (FALKINHAM,1996). O advento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) resultou em um aumento da incidência de infecções por MAC, e tem sido reconhecida como uma das infecções bacterianas oportunistas mais comuns, causando doença disseminada em indivíduos infectados pelo HIV (INDERLIED, 1993; HORSBURGH JR., 1997; REDDY, 1998;).

O freqüente encontro do MAC na água e no solo é coerente com o papel destes microrganismos como patógenos oportunistas adquiridos do meio ambiente e é também coerente com a suposição de que as portas de infecção primária em humanos são os tratos respiratórios e gastrointestinal. De qualquer modo, quando ocorre infecção, é provavelmente um resultado de uma combinação da deficiência dos mecanismos imunológicos do hospedeiro e dos fatores de virulência do MAC, talvez especialmente a habilidade desses microrganismos em aderir e invadir as células epiteliais (INDERLIED, 1997).

Os fatores de virulência e patogenicidade destes patógenos oportunistas, ainda não foram claramente compreendidos. Há indicações de que a virulência depende da estirpe do MAC. Os isolados de pacientes aidéticos têm se mostrado mais virulentas que os isolados do meio ambiente. Os sorotipos 4, 8 e 1 são os mais comumente isolados de pacientes infectados com o HIV. A grande maioria das estirpes isoladas de pacientes com AIDS contém um ou mais plasmídeos. Porém, tentativas para explicar a relação entre sorotipo e virulência ou presença plasmídica e virulência são relativamente frágeis, uma vez que sorotipos 4 e 8 também são isolados de pacientes não aidéticos e MAC com plasmídeos também

são isolados do meio ambiente. Existem também propostas para se estabelecer relação entre virulência e característica das colônias do MAC em meio sólido (REDDY, 1998). As variantes lisas transparentes (LT) são as mais freqüentes em isolados clínicos, enquanto as lisas opacas (LO) e as rugosas opacas (RO) são freqüentemente isoladas do meio ambiente, porém a variação na morfologia da colônia é transitória e reversível. Uma outra característica, não relacionada à virulência, é que as formas LT são mais resistentes a drogas que as formas LO, possivelmente por diferentes graus de permeabilidade da parede celular bacteriana (REDDY, 1996). Estudos também tentam relacionar a virulência e a presença da seqüência de inserção IS901 em estirpes de MAC (PAVLIK et al., 2000). MASLOW, et al. (1999) sugerem que a expressão de hemolisina pelo MAC representa um fator de virulência necessário à ocorrência da doença invasiva.

Além da relevância para a Saúde Pública, microrganismos pertencentes ao MAC têm uma grande importância para a suinocultura moderna. Em países onde a tuberculose bovina tem sido erradicada e o controle da tuberculose humana é bem-sucedido, há uma crescente prevalência da tuberculose suína causada pelo MAC (YACHIDA e SHIMIZU, 1973).

As linfadenites granulomatosas dos suínos, localizadas 94% das vezes no trato digestivo (JANETSCHKE, 1963), têm sido estudadas em várias partes do mundo com o objetivo de se conhecer a etiologia de tais lesões (CLAAP, 1956; TAMMEMAGI e SIMMONS, 1971 na Austrália; THOEN et al., 1975 nos Estados Unidos; MEISSNER et al., 1978 na França e Alemanha; CASTRO et al., 1978 e BALIAN et al., 1997 no Brasil; TAPARELLI e MARZADORI, 1990 na Itália, SZABO et al., 1975 na Hungria; YUGLI e NEMOTO, 1972 no Japão). Estas ocorrências além de gerar perdas econômicas por condenações no abate (ACLAND e WHITLOCK, 1986; DEY e PARHAM, 1993; MARTINS, 2001), representam potencial risco para a Saúde Pública (SZAZADOS, 1993), uma vez que ainda não são conhecidas todas as possíveis interrelações agente, hospedeiros e meio ambiente.

Programas de erradicação da tuberculose bovina, como aquele iniciado em 1917, nos Estados Unidos (REIS, 1965), não incluíram a espécie suína, considerando que a prevalência nessa espécie seria reduzida em consequência das medidas profiláticas aplicadas para os rebanhos bovinos (THOEN e KARLSON, 1986). Mas a execução de tais programas alcançando prevalências bastante baixas na população bovina em países como Alemanha, Bélgica, Inglaterra, França e Portugal, chegando a erradicar a tuberculose bovina na Dinamarca,

Holanda e Luxemburgo (CAFFREY, 1994) não garantiu a eliminação das linfadenites granulomatosas nos suínos.

É notória na literatura a decrescente ocorrência do *M. bovis* como etiologia de tais lesões e o aumento dos isolados de representantes do MAC (BALIAN et al., 1997; CASTRO et al., 1978; EVERITT et al., 1982; PRITCHARD et al., 1977). Este fato pode ser relacionado à crescente tecnificação da suinocultura, tendo como consequência a redução do contato direto ou indireto com bovinos ao mesmo tempo que vem oferecendo condições para a introdução de outras micobactérias que não as tuberculosas (MOTT) e o estabelecimento de ciclos dinâmicos de transmissão desses agentes.

No Brasil já foram isoladas de linfadenites de suínos as seguintes espécies: *M. tuberculosis*; *M. bovis*, Complexo *M. avium-intracellulare*; *M. scrofulaceum*; *M. gordonae*, *M. terrae* (CORREA e CORREA, 1973; GONTIJO FILHO, 1974; LANGENEGGER et al., 1975; MOTA et al., 1980; FERREIRA NETO et al., 1989; BALIAN et al., 1997), *M. flavescens* e *M. fortuitum* (CASTRO et al., 1978).

No relativo ao controle das infecções por MAC em suínos, estudos recentes mostram que em determinadas regiões elas estão associadas ao meio ambiente, principalmente a cama (BROOKS,

1971; REZNIKOV et al., 1971; REZNIKOV et al., 1973; SONGER et al., 1980; GARDNER e HIRD, 1989; CHARETTE et al., 1989;) e/ou manejo e/ou à presença de reservatórios silvestres (principalmente aves) (ALFREDSEN e SKJERVE, 1993), portanto fatores de risco externos, que uma vez individualizados e suprimidos resultariam no controle da infecção. O que não está muito claro é se a transmissão horizontal - suíno-suíno - tem alguma importância na manutenção da doença dentro das criações (CHARETTE et. al.,1989), o que significaria uma estratégia de controle diferente da anterior, baseada no diagnóstico e eliminação dos positivos (possíveis fontes de infecção). Logicamente, a transmissão horizontal vai depender da agressividade da estirpe de micobactéria envolvida, assim como da dose infectante (OLIVEIRA, 1989). Portanto, num programa de controle regional, torna-se importante uma caracterização precisa das estirpes envolvidas (quantas são, onde ocorrem e a que estão associadas), para que se conheça a epidemiologia da doença e se estabeleça o método de controle mais adequado.

A possibilidade de reprodução da tuberculose em modelos biológicos sob condições controladas, como em animais de laboratório de fácil manutenção e manejo, é útil aos estudiosos desta doença. O hamster tem sido empregado como modelo biológico experimental da

tuberculose, reproduzindo com facilidade o processo desencadeado pela inoculação experimental do *Mycobacterium bovis* (FERREIRA NETO et al., 1994) e do *Mycobacterium avium* isolado de linfadenite de suíno, através da avaliação quantitativa da concentração do agente em diferentes órgãos e da evolução das lesões macro e microscópicas no tempo (BALIAN, 1999). O camundongo *beige* foi considerado por BERMUDEZ et al. (1992) como um modelo experimental bem adaptado aos estudos de infecção aguda com MAC.

Ovos embrionados também têm sido utilizados como modelo biológico para avaliar a virulência entre estirpes de MAC (LONG, et al., 2000).

Na atual fase do projeto "Epidemiologia e controle das micobacterioses suínas no sul do Brasil" (Processo FAPESP 1998/11746-1) já foi possível constatar que o microrganismo de maior importância na ocorrência das micobacterioses suínas é o *Mycobacterium avium* (LEÃO et al., 1999) e existem quatro diferentes famílias de estirpes desse agente circulando na região. A caracterização das espécies de micobactérias foi realizada com métodos moleculares (PCR *Restriction Analysis* - PRA) e a variabilidade de estirpes de *M. avium* foi determinada pela técnica de

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), conforme metodologia preconizada por VAN SOOLINGEN et al. (1998).

Tendo sido comprovada a existência de quatro famílias molecularmente distintas de *M. avium* circulando na população de suínos da região sul do Brasil, e havendo dúvidas a respeito da importância da transmissão horizontal como mecanismo de manutenção da doença, justifica-se um estudo da virulência dessas estirpes pois, dependendo desses resultados, os métodos de controle poderão ser aperfeiçoados.

Assim sendo o presente estudo tem por objetivo verificar se existe diferença de virulência entre as estirpes molecularmente distintas, utilizando a infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e posterior quantificação do agente nos órgãos, de acordo com a metodologia descrita por FERREIRA NETO et al., 1994 e BALIAN et al., 1997.

MATERIAL E MÉTODO

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Animais

Foram utilizados 200 hamsters fêmeas, com peso entre 70 e 160 gramas, nascidas no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Durante o experimento os animais receberam ração comercial e água e foram mantidos sobre cama de maravalha.

2.2 Agente Infectante

As estirpes foram obtidas do estudo caso-controle, onde as tipagens moleculares por RFLP permitiram a organização dos padrões encontrados em quatro famílias de *Mycobacterium avium*. Por esta técnica a presença e a distribuição da seqüência de inserção IS 1245 foram determinadas por hibridação molecular (VAN SOOLINGEN et al., 1998). As Figs. 1 a 4 mostram os padrões de RFLP dessas quatro famílias, bem como suas distribuições espaciais.

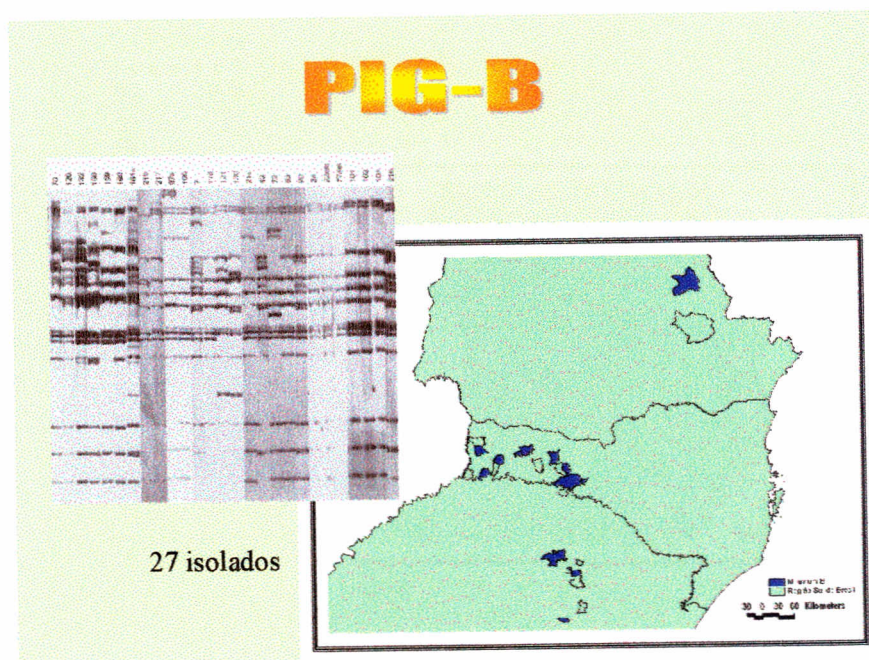


Figura 1 - Padrões de RFLP da família PIG-B e sua distribuição espacial por município - Brasil - 2001

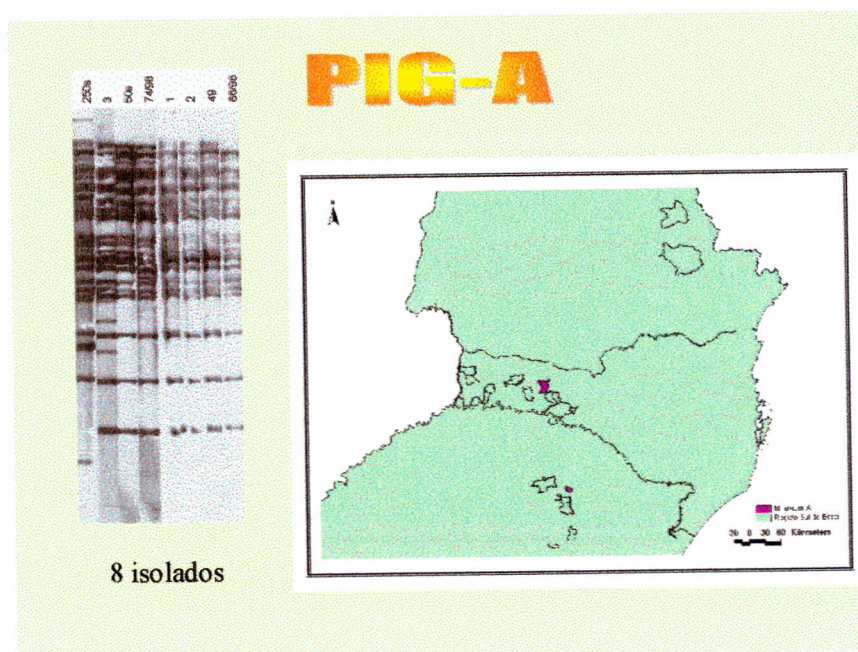


Figura 2 - Padrões de RFLP da família PIG-A e sua distribuição espacial por município - Brasil - 2001

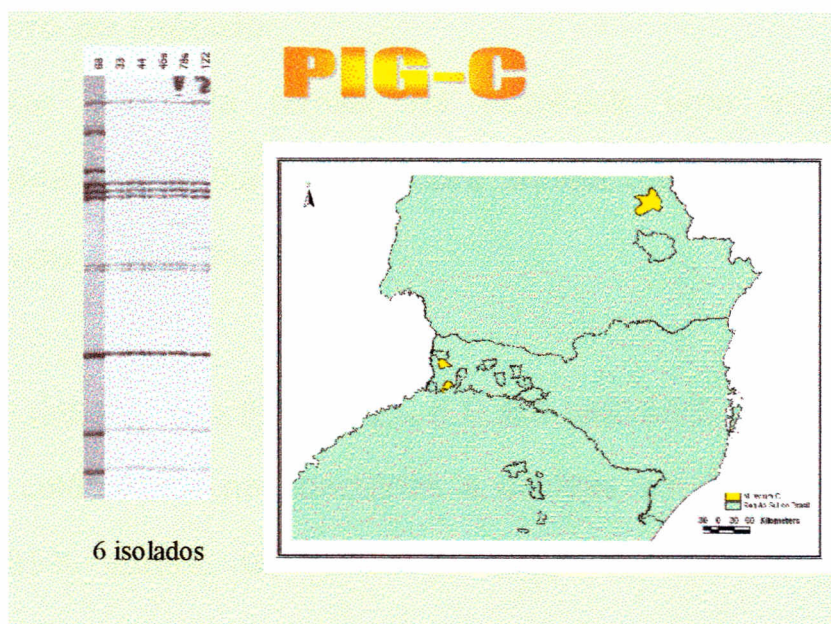


Figura 3 - Padrões de RFLP da família PIG-C e sua distribuição espacial por município - Brasil - 2001

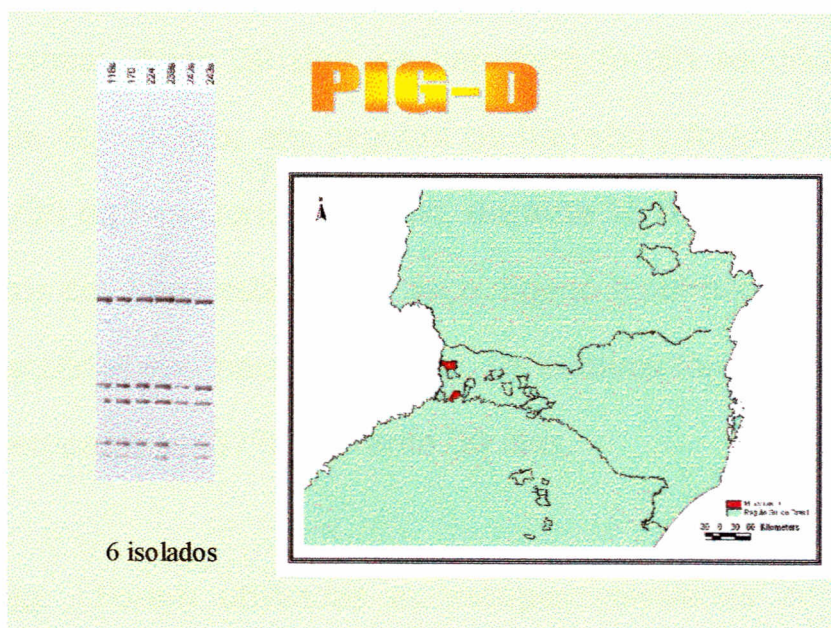


Figura 4 - Padrões de RFLP da família PIG-D e sua distribuição espacial por município - Brasil - 2001

2.3 Preparo do Inóculo

Dentro de cada família foi escolhida uma estirpe para representá-la. A escolha recaiu sobre aquela que apresentou perfil genético mais freqüente.

1ª. Fase

Passagem das estirpes Pig-A, B, C e D em hamsters. Foram pesados 0,02g de colônias de micobactérias e diluídas em 10mL de solução salina 0,85% estéril. O inóculo foi preparado em frasco estéril contendo pérolas de vidro para facilitar a dispersão das bactérias no veículo de maneira que cada 0,5mL tivesse 1,0 mg de micobactérias. Para cada estirpe foram inoculados dois hamsters com 0,5mL pela via intra-peritoneal. Após 30 dias os hamsters foram sacrificados com vapores de éter etílico, em seguida os hamsters foram imersos em solução 1/30 de hipoclorito de sódio, durante 15 minutos, após o que foram feitas colheitas estéreis de baço, fígado e pulmão, para o cultivo de micobactérias em meio Petragani. Os cultivos foram mantidos em estufa a temperatura 37°C, durante 30 dias.

2ª. Fase

Pré-inóculo. Foram utilizadas as estirpes reisoladas do baço por terem apresentado um maior crescimento.

As estirpes até então cultivadas em meio Petragnani foram passadas para o meio líquido 7H9 e colocadas para incubar no shaker a 37°C. Após 7 dias de incubação, observou-se ótimo crescimento do pré-inóculo, do qual foi passado 10µL para 10 mL de 7H9 e incubado a 37°C no shaker até obter bom crescimento, o que ocorreu após 2 dias. Em seguida adicionou-se solução salina 0,85% estéril nos tubos até se obter a concentração 10^9 bactérias/mL da escala de Mac Farland. Em seguida o inóculo obtido de cada uma das estirpes foi distribuído em 12 eppendorfs e congelados a temperatura - 80°C. Após 10 dias um eppendorf representativo de cada estirpe foi descongelado, diluído seriadamente na razão 10 e cada diluição foi semeada em meio 7H10 para a contagem de U.F.C. 15 dias após a semeadura.

A partir das contagens obtidas foi possível estabelecer a estratégia de inoculação, de modo a garantir que cada animal do experimento, de qualquer um dos grupos, receba 30.000 unidades formadoras de colônias (U.F.C.) de *M. avium*.

Foi realizado o controle da viabilidade do inóculo imediatamente após a sua preparação, semeando-o em meio Petragnani e incubando-o em estufa a 37°C por duas semanas.

2.4 Delineamento Experimental

Formou-se quatro grupos experimentais, cada um contendo 48 hamsters, que receberam (cada animal) o agente infectante, e o grupo controle que recebeu apenas o veículo do inóculo.

No dia zero o inóculo foi administrado em cada animal pela via intra-peritoneal. Nos dias 2; 13; 26 e 40 pós-inoculação, 12 animais de cada grupo e um do controle foram sacrificados. Os detalhes da formação dos grupos encontram-se na Tab.1.

Tabela 1 - Número de animais sacrificados segundo os grupos e tempos experimentais - São Paulo - 2001

GRUPOS	TEMPOS EXPERIMENTAIS			
	1º	2º	3º	4º
	2 dias p.i.*	13 dias p.i.	26 dias p.i.	40 dias p.i.
1 (<i>M. avium</i> – família Pig-A)	12	12	12	12
2 (<i>M. avium</i> – família Pig-B)	12	12	12	12
3 (<i>M. avium</i> – família Pig-C)	12	12	12	12
4 (<i>M. avium</i> – família Pig-D)	12	12	12	12
CONTROLES	02	02	02	02

*p.i.: pós-inoculação

Antes do sacrifício, os animais foram anestesiados com éter etílico para a colheita de 0,5mL de sangue. O sangue foi imediatamente diluído em 4,5mL de salina estéril. Do diluído foi semeado 0,1mL em placas de Petri contendo o meio sólido Petragnani para cultivo de micobactérias, com o objetivo de constatar eventuais fases de bacteremia.

Em seguida, a anestesia com vapores de éter etílico foi aprofundada até o sacrifício e os animais foram imersos em solução 1/30 de hipoclorito de sódio, durante 15 minutos, após o que foram feitas colheitas estéreis de baço, fígado e pulmão para o cultivo quantitativo de micobactérias e exame histológico. Cada órgão foi inicialmente pesado e triturado em stomacher, acrescentando-se 2mL de solução salina 0,85% estéril. Após completa homogeneização esse volume foi transferido para uma proveta com capacidade de 50mL e o volume completado para 10mL, este volume final foi denominado de diluição inicial, a partir da qual foi obtida mais uma, de razão dez. De cada uma das diluições, de cada um dos órgãos foram semeadas duas placas com meio Petragnani na quantidade de 0,1mL/placa. Os cultivos foram mantidos em estufa a temperatura de 37°C, observadas a cada sete dias e a contagem do número de U.F.C. foi realizada após 30 dias de incubação.

Para a contagem das U.F.C. foram adotados os seguintes critérios: a) média aritmética das duas placas quando em qualquer das diluições as contagens de U.F.C. não superavam 300 – havendo duas diluições que satisfizessem esse critério, foi sempre adotada aquela de menores contagens; b) quando mesmo na maior diluição as placas apresentavam contagens de U.F.C. superiores a 300, foi adotado para efeito de cálculo o número 300, e o resultado foi expresso em valor antecedido pelo sinal >. Esses critérios foram adaptados de BRASIL, (1992).

Para permitir a expressão dos resultados das contagens em U.F.C. /g de órgão, foi obedecida a seguinte seqüência de regras de três:

10 mL diluição inicial ⇒ Xg de órgão pesado		
0,1 ml semeado	⇒ Yg de órgão	⇒ Z (U.F.C. contadas)
	Em 1 grama de órgão ⇒	W U.F.C. x correção diluição
		Resultado Final (U.F.C. /g órgão)

O mesmo critério foi adotado para a expressão das contagens de U.F.C./mL de sangue, trocando-se as unidades de medida (g por mL).

O exame histológico foi realizado através do método clássico de obtenção de cortes finos corados pela Hematoxilina-eosina, posteriormente examinados em microscopia de luz comum.

2.5 Tratamento Estatístico

As contagens em U.F.C. a partir dos órgãos examinados foram analisados através de testes não paramétricos (Kruskal Wallis e Mann Whitney), confrontando-se os valores obtidos para cada um dos órgãos nos diferentes tempos experimentais (2, 13, 26 e 40 dias pós-inoculação). As análises foram realizadas através do programa SPSS for Windows ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

3 RESULTADOS

Durante todo o experimento não houve mortalidade de animais inoculados e não foi verificada a presença bacteriana nos órgãos dos animais controles.

Em nenhuma oportunidade foi observada a presença de lesão granulomatosa nos pulmões.

No baço e fígado, nos quatro tempos experimentais, para as quatro estirpes, foram encontradas lesões granulomatosas. As Figs. 5, 6, 7 e 8 ilustram a evolução dessas lesões em fígado.

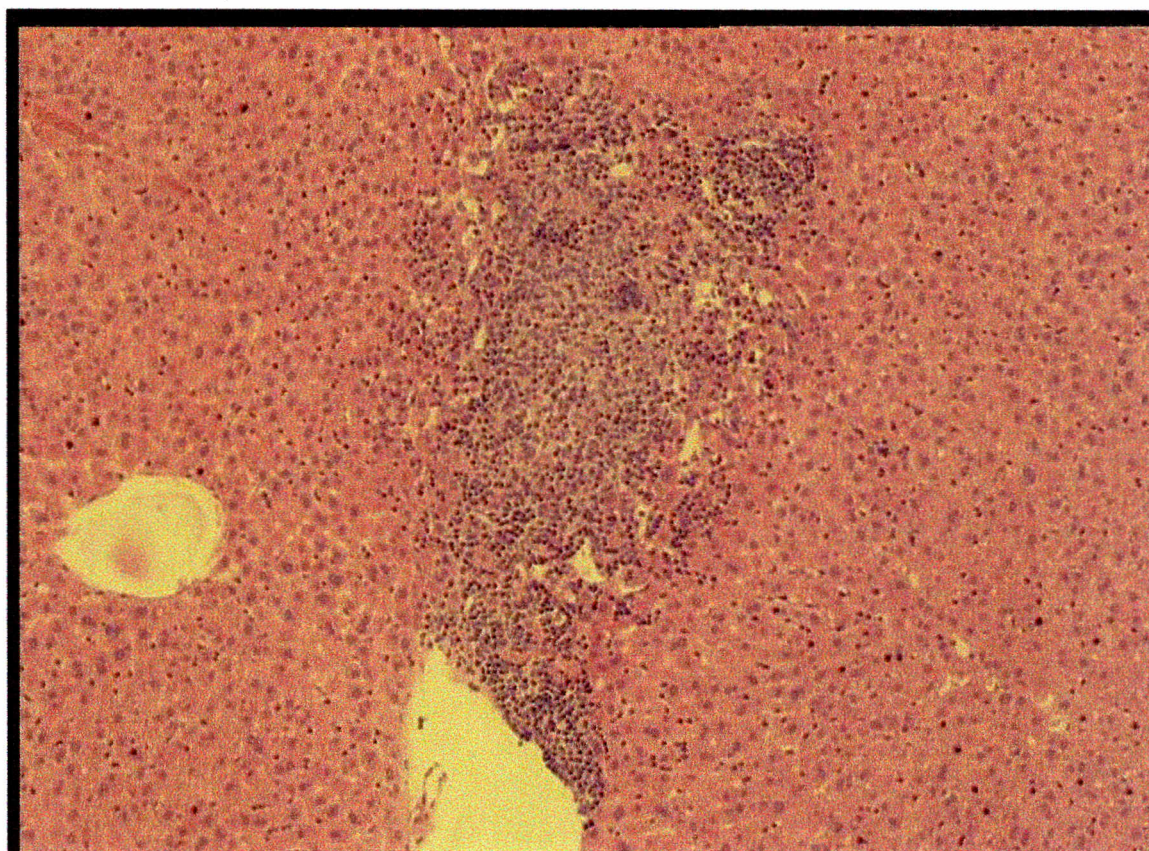


Figura 5 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de hamster inoculado com a estirpe PIG-B aos dois dias pós-inoculação intra-peritoneal, mostrando granuloma específico. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 40X.

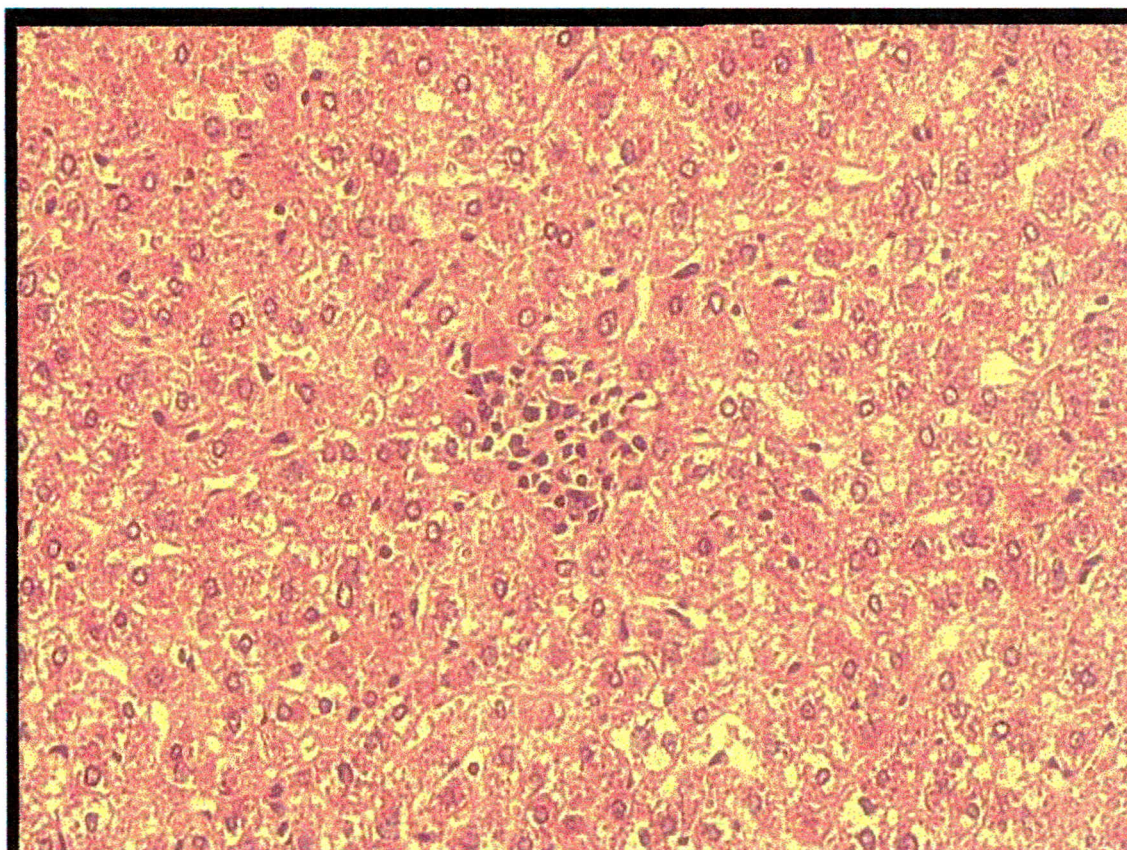


Figura 6 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de hamster inoculado com a estirpe PIG-B aos 13 dias pós-inoculação intra-peritoneal, mostrando granuloma específico. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 100X.

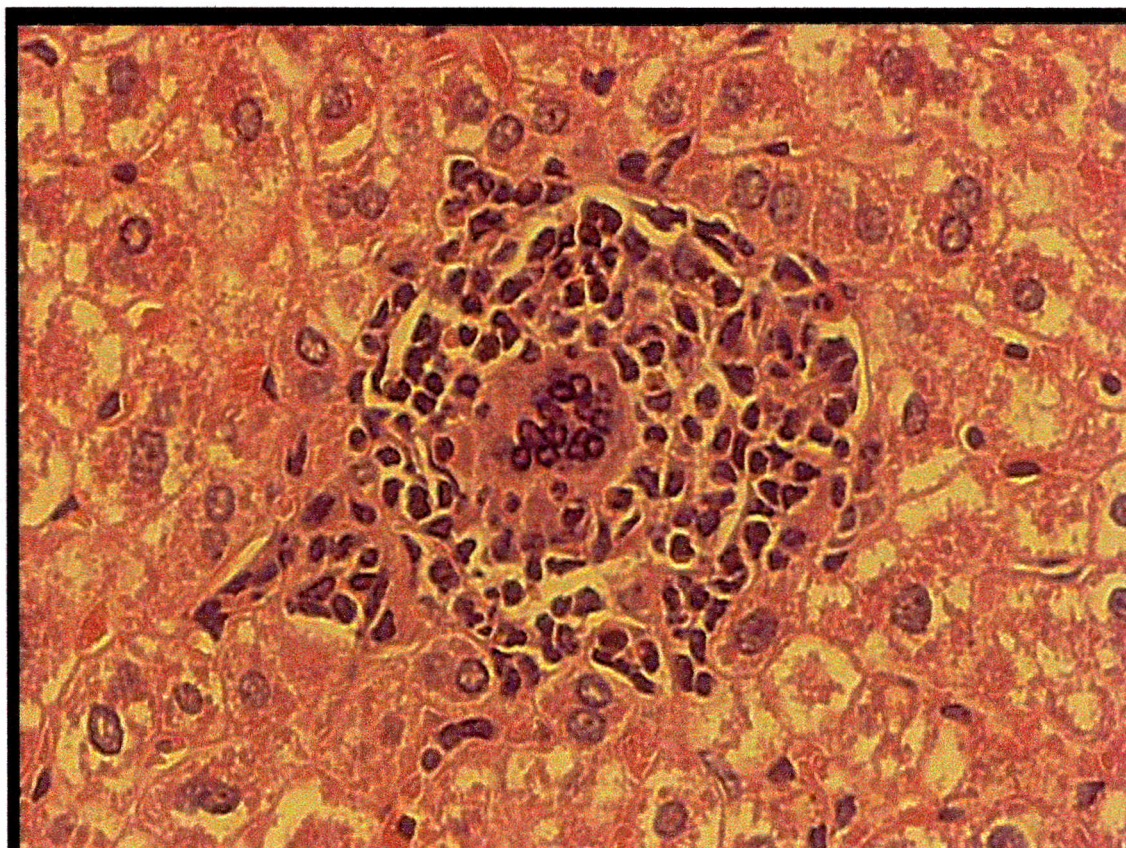


Figura 7 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de hamster inoculado com a estirpe PIG-B aos 26 dias pós-inoculação intra-peritoneal, mostrando granuloma específico. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.

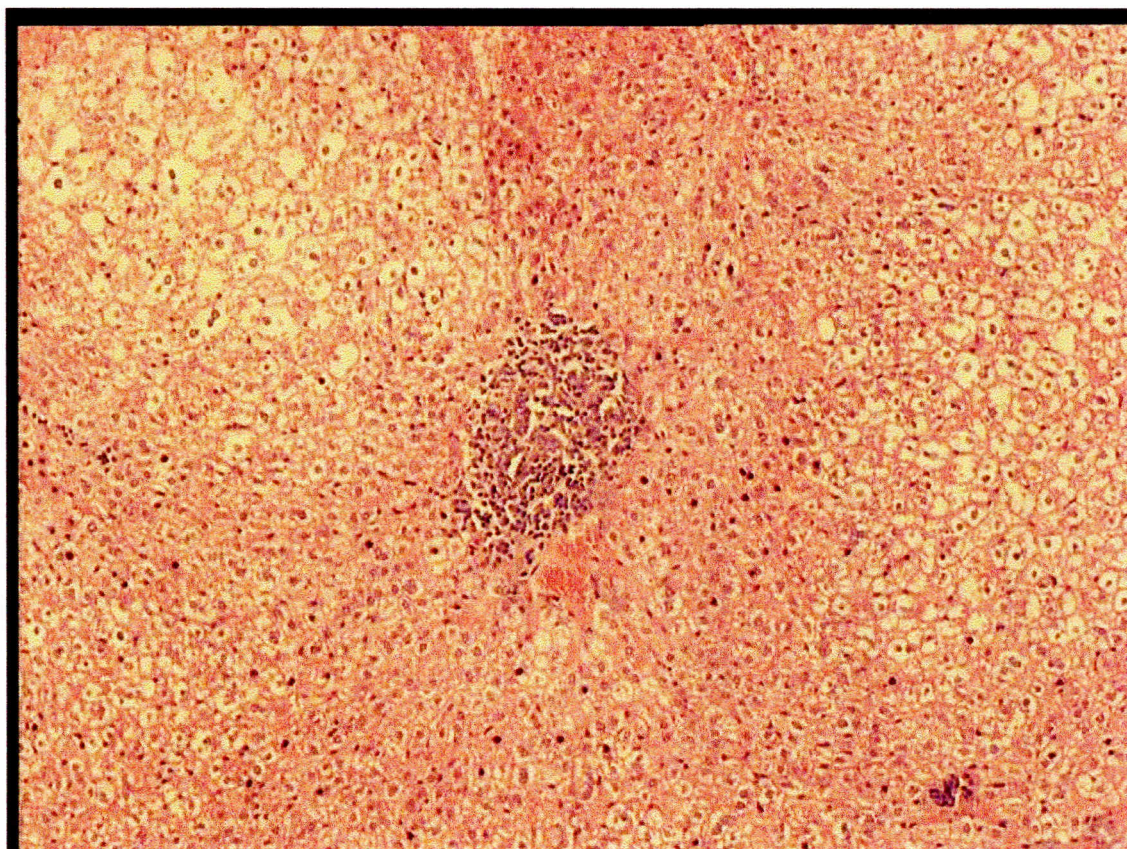


Figura 8 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de hamster inoculado com a estirpe PIG-B aos 40 dias pós-inoculação intra-peritoneal, mostrando granuloma específico. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 40X.

Os resultados das contagens de U.F.C. em órgãos e sangue estão organizados nas Tabs. de 2 a 5.

Tabela 2 - Resultados das contagens de U.F.C. em órgãos de hamsters inoculados à dois dias pela via intra-peritoneal com quatro estirpes de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001

Estirpes	animais	Número de U.F.C. /g de órgão		
		Fígado	Baco	Pulmão
PTG-A	1	960	20000	330
	2	1300	89000	750
	3	1700	7400	330
	4	1600	69000	-*
	5	1100	19000	330
	6	1400	52000	2000
	7	880	14000	330
	8	-	30000	-
	9	1200	38000	670
	10	310	22000	1000
	11	83	43000	-
	12	1600	30000	500
PTG-B	1	2700	63000	3300
	2	3600	44000	6000
	3	5500	60000	-
	4	1300	63000	500
	5	6900	120000	3500
	6	3600	70000	2500
	7	19500	110000	4000
	8	380	3500	500
	9	7400	61000	3300
	10	3400	66000	1500
	11	5900	45000	1300
	12	7100	250000	2000
PTG-C	1	-	1000	-
	2	-	12000	500
	3	-	-	-
	4	250	1000	500
	5	-	-	-
	6	-	1000	-
	7	-	-	-
	8	-	2000	-
	9	-	2000	-
	10	170	100	-
	11	-	-	-
	12	-	1000	-
PTG-D	1	-	2000	-
	2	140	7000	-
	3	250	2500	-
	4	220	2000	-
	5	660	4500	-
	6	290	4500	-
	7	140	4000	-
	8	220	3300	-
	9	-	-	-
	10	220	1000	100
	11	220	2000	-
	12	130	6000	-

* Sem crescimento

Tabela 3 - Resultados das contagens de U.F.C. em órgãos de hamsters inoculados à 13 dias pela via intra-peritoneal com quatro estirpes de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001

Estirpes	animais	Número de U.F.C. /g de órgão		
		Fígado	Baco	Pulmão
PTG-A	1	860	900000	-*
	2	2000	710000	330
	3	890	270000	-
	4	2900	300000	-
	5	2700	380000	-
	6	3600	110000	-
	7	-	-	-
	8	1300	250000	-
	9	150	240000	-
	10	-	43000	38000
	11	2900	140000	-
	12	2200	200000	-
PTG-B	1	420	550000	-
	2	2000	1500000	-
	3	23000	670000	-
	4	9200	1500000	100
	5	1100	900000	100
	6	1800	400000	-
	7	330	1300000	-
	8	2600	340000	-
	9	4200	1200000	-
	10	800	670000	-
	11	630	680000	-
	12	1100	1100000	-
PTG-C	1	-	500	-
	2	130	1500	-
	3	400	2000	-
	4	110	500	-
	5	-	20000	-
	6	130	6500	-
	7	-	2000	-
	8	-	2700	-
	9	560	2000	-
	10	130	1000	-
	11	-	3000	-
	12	-	12000	-
PTG-D	1	200	36000	-
	2	290	13000	-
	3	130	2500	-
	4	200	3500	-
	5	110	5000	-
	6	670	9000	-
	7	640	32000	-
	8	500	15000	-
	9	400	2000	-
	10	440	5000	-
	11	-	6500	-
	12	-	6500	-

* Sem crescimento

Tabela 4 - Resultados das contagens de U.F.C. em órgãos de hamsters inoculados à 26 dias pela via intra-peritoneal com quatro estirpes de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001

Estirpes	animais	Número de U.F.C./g de órgão		
		Fígado	Baco	Pulmão
PTG-A	1	900	300000	-*
	2	1200	300000	-
	3	1400	300000	-
	4	500	350000	-
	5	1700	370000	-
	6	2000	280000	-
	7	750	460000	-
	8	570	360000	-
	9	800	430000	-
	10	500	340000	-
	11	1500	50000	-
	12	1200	320000	-
PTG-B	1	1300	700000	-
	2	1400	530000	-
	3	-	1000	-
	4	750	280000	-
	5	2800	400000	-
	6	800	750000	-
	7	330	220000	-
	8	670	200000	-
	9	830	600000	-
	10	830	380000	-
	11	-	6500	-
	12	140	390000	-
PTG-C	1	-	9300	-
	2	200	33000	-
	3	-	20000	-
	4	-	38000	-
	5	330	9900	-
	6	290	18000	-
	7	-	24000	-
	8	-	15000	-
	9	-	11000	-
	10	140	12000	-
	11	-	4500	-
	12	-	41000	-
PTG-D	1	220	64000	-
	2	130	67000	-
	3	110	150000	-
	4	1100	180000	400
	5	-	6000	-
	6	-	90000	-
	7	430	250000	-
	8	330	95000	-
	9	880	500000	-
	10	140	190000	-
	11	2100	85000	-
	12	170	130000	-

* Sem crescimento

Tabela 5 - Resultados das contagens de U.F.C. em órgãos de hamsters inoculados à 40 dias pela via intra-peritoneal com quatro estirpes de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001

Estirpes	animais	Número de U.F.C. /g de órgão		
		Fígado	Baco	Pulmão
PTG-A	1	1000	390000	.*
	2	670	380000	-
	3	1300	220000	-
	4	400	260000	-
	5	600	210000	-
	6	800	580000	-
	7	450	230000	-
	8	580	190000	-
	9	180	170000	-
	10	-	53000	-
	11	500	220000	-
	12	300	260000	-
PTG-B	1	-	200000	-
	2	600	360000	1000
	3	1000	160000	-
	4	570	380000	-
	5	570	380000	-
	6	-	11000	-
	7	400	170000	-
	8	830	200000	-
	9	290	310000	-
	10	250	240000	-
	11	500	190000	-
	12	860	620000	-
PTG-C	1	200	8000	-
	2	130	8500	-
	3	-	10000	-
	4	200	41000	-
	5	-	15000	-
	6	800	50000	-
	7	140	42000	-
	8	-	15000	-
	9	-	20000	-
	10	-	16000	-
	11	-	51000	-
	12	-	18000	-
PTG-D	1	130	43000	-
	2	330	110000	-
	3	220	79000	-
	4	330	81000	-
	5	290	80000	-
	6	-	49000	-
	7	170	96000	-
	8	-	-	-
	9	-	200000	-
	10	140	110000	-
	11	380	18000	-
	12	-	69000	-

* Sem crescimento

No sangue foi observada a presença do agente no primeiro tempo experimental para as estirpes PIG-A (3 animais), PIG-B (5 animais) e PIG-D (1 animal). No segundo tempo experimental a bacteremia foi observada apenas em dois animais inoculados com a estirpe PIG-B. Nos demais tempos não foi constatada a presença do agente no sangue.

Para a estirpe PIG-A, a comparação do número de U.F.C. entre os tempos experimentais mostrou haver diferença para os três órgãos (fígado: $p=0,054$; baço: $p<0,001$; pulmão: $p<0,001$). Os Gráfs. 1, 2 e 3 ilustram a evolução das contagens.

Gráfico 1 - Evolução das contagens de U.F.C. em fígado de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-A de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001

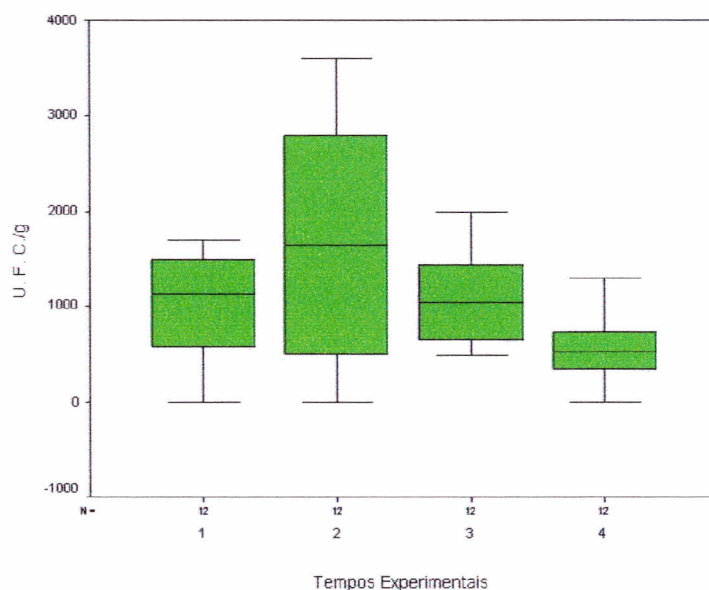


Gráfico 2 - Evolução das contagens de U.F.C. em baço de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-A de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001

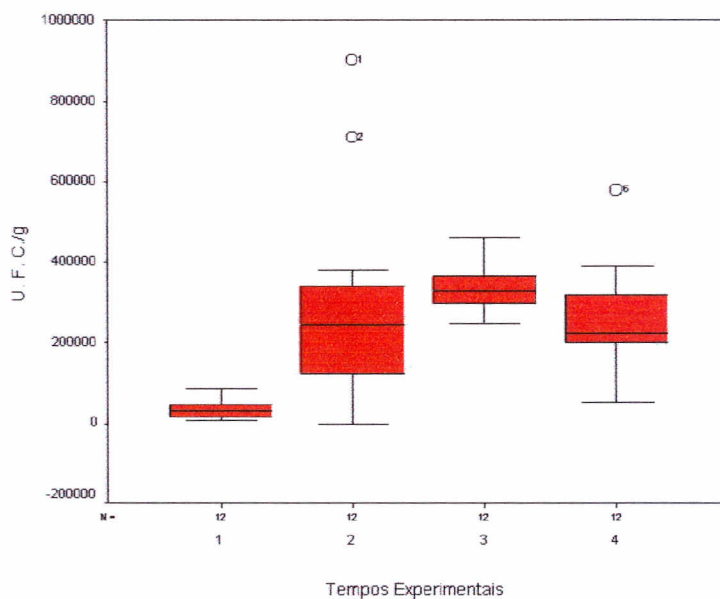
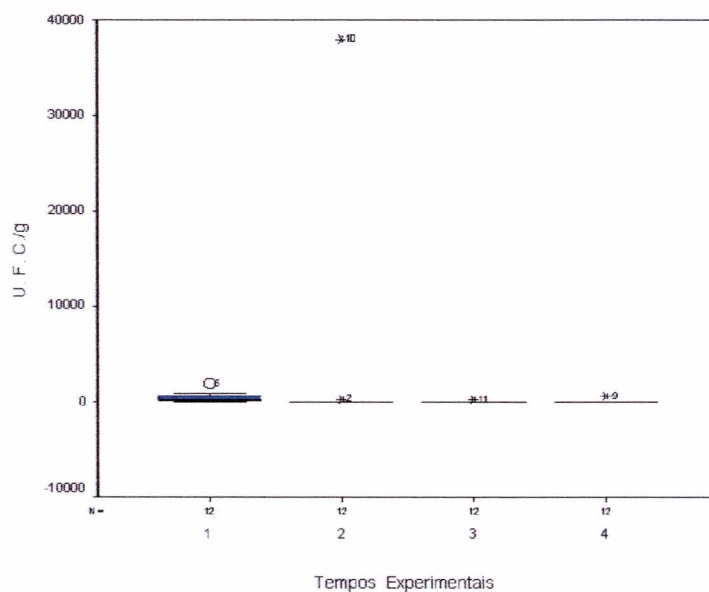


Gráfico 3 - Evolução das contagens de U.F.C. em pulmão de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-A de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001



Para a estirpe PIG-B, a comparação do número de U.F.C. entre os tempos experimentais mostrou haver diferença para os três órgãos (fígado: $p < 0,001$; baço: $p < 0,001$; pulmão: $p < 0,001$). Os Grafs. 4, 5 e 6 ilustram a evolução das contagens.

Gráfico 4 - Evolução das contagens de U.F.C. em fígado de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-B de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001

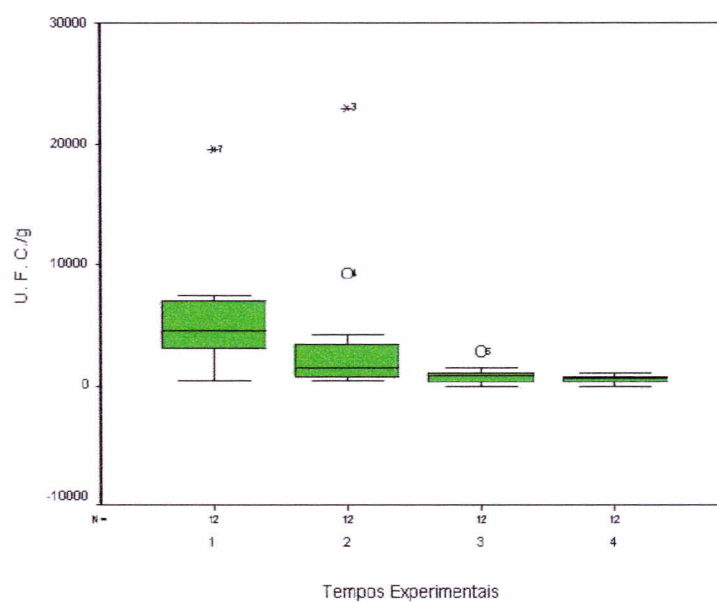


Gráfico 5 - Evolução das contagens de U.F.C. em baço de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-B de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001

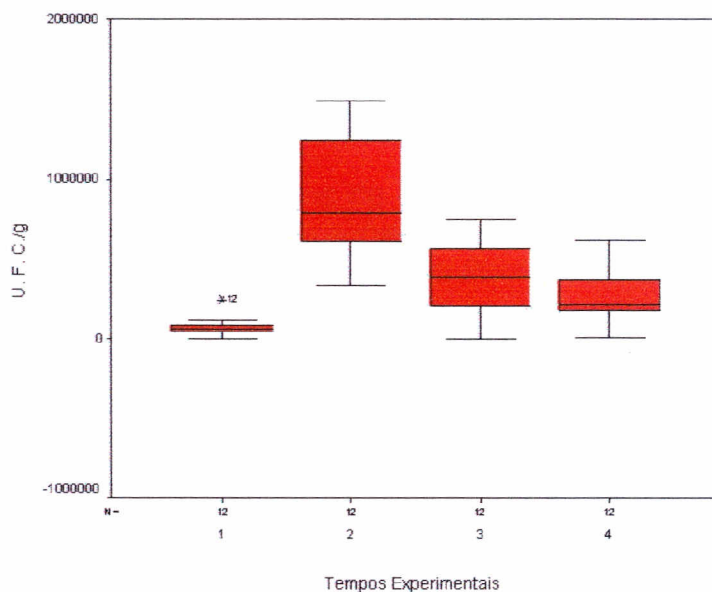
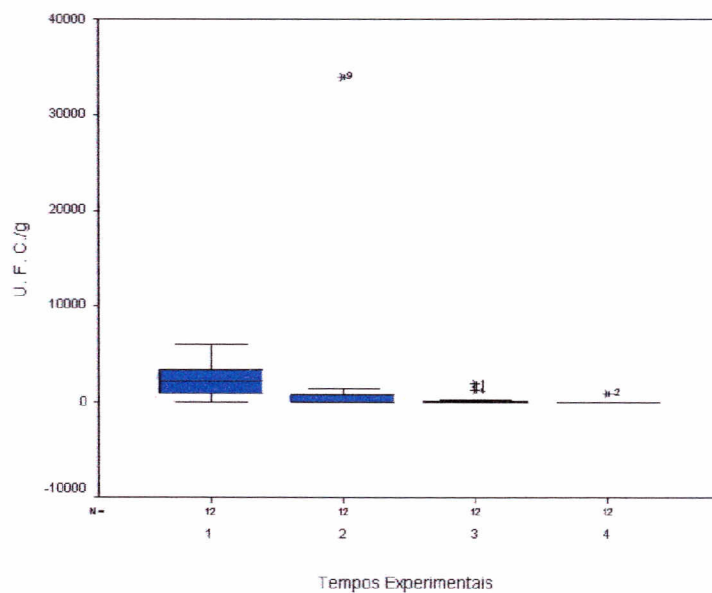


Gráfico 6 - Evolução das contagens de U.F.C. em pulmão de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-B de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001



Para a estirpe PIG-C, a comparação do número de U.F.C. entre os tempos experimentais mostrou haver diferença apenas para o baço ($p < 0,001$). Os Grafs. 7, 8 e 9 ilustram a evolução das contagens.

Gráfico 7 - Evolução das contagens de U.F.C. em fígado de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-C de *Mycobacterium avium* – São Paulo – 2001

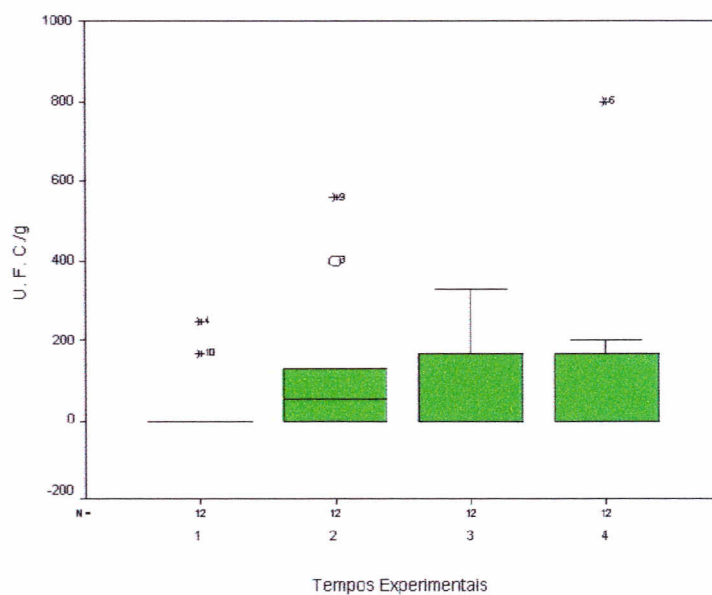


Gráfico 8 - Evolução das contagens de U.F.C. em baço de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-C de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001

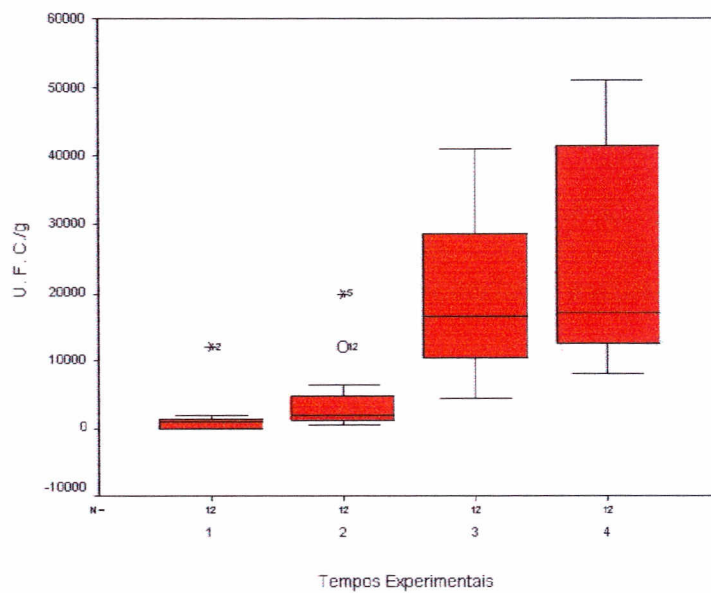
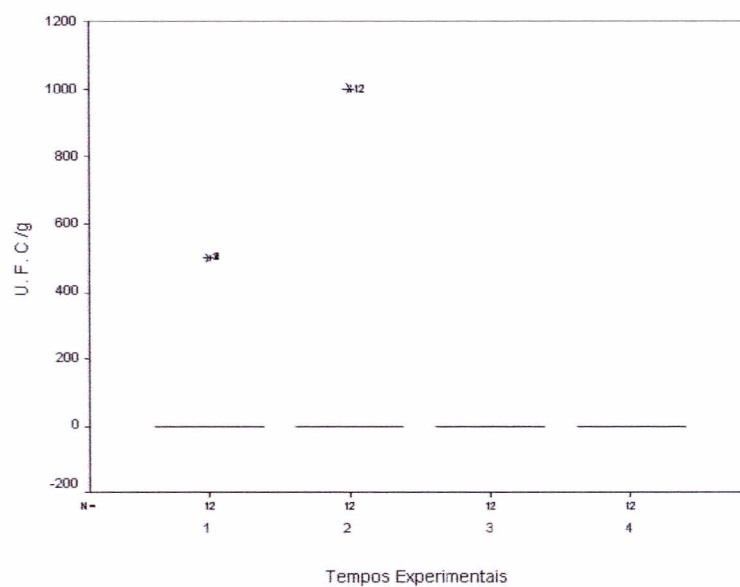


Gráfico 9 - Evolução das contagens de U.F.C. em pulmão de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-C de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001



Para a estirpe PIG-D, a comparação do número de U.F.C. entre os tempos experimentais mostrou haver diferença apenas para o baço ($p < 0,001$). Os Gráfs. 10, 11 e 12 ilustram a evolução das contagens.

Gráfico 10 - Evolução das contagens de U.F.C. em fígado de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-D de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001

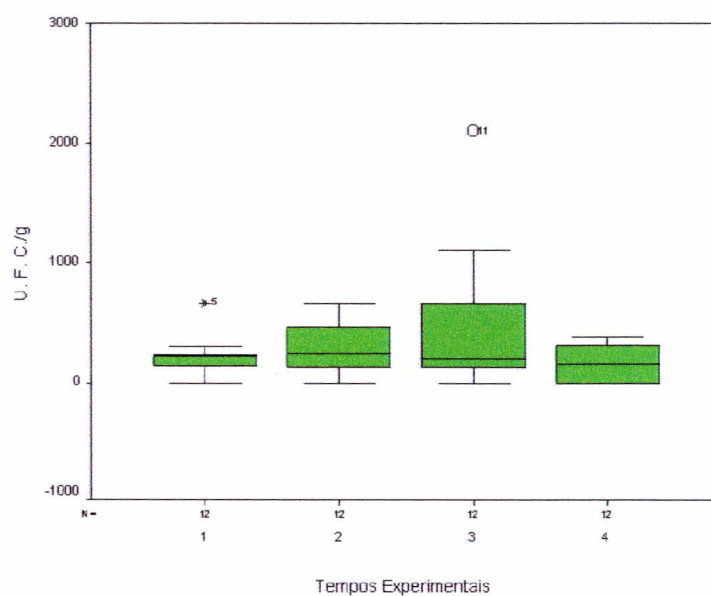


Gráfico 11 - Evolução das contagens de U.F.C. em baço de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-D de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001

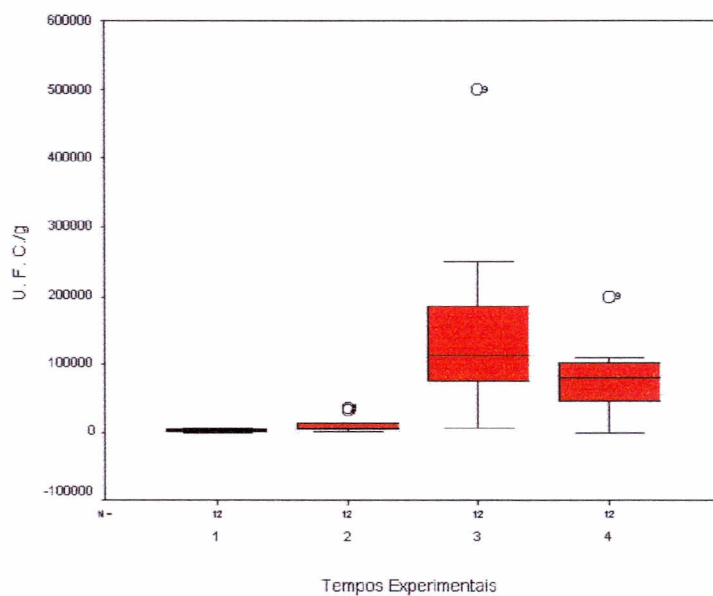
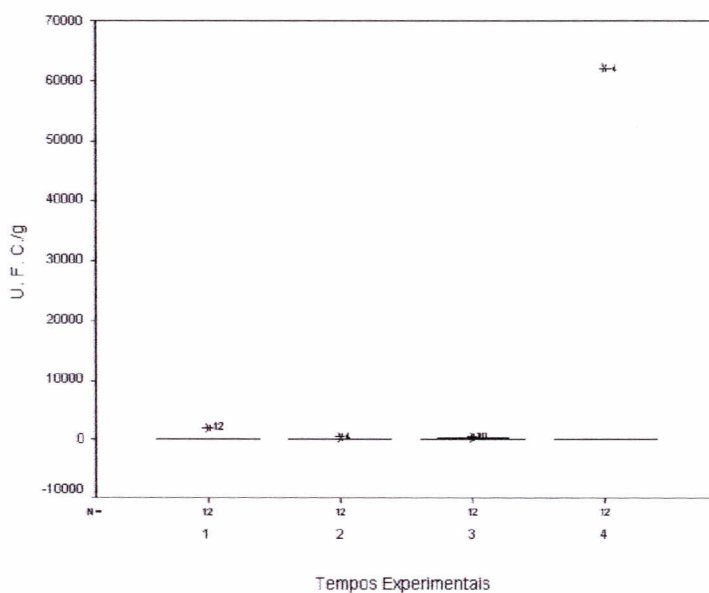


Gráfico 12 - Evolução das contagens de U.F.C. em pulmão de hamsters inoculados pela via intra-peritoneal com a estirpe PIG-D de *Mycobacterium avium* - São Paulo - 2001



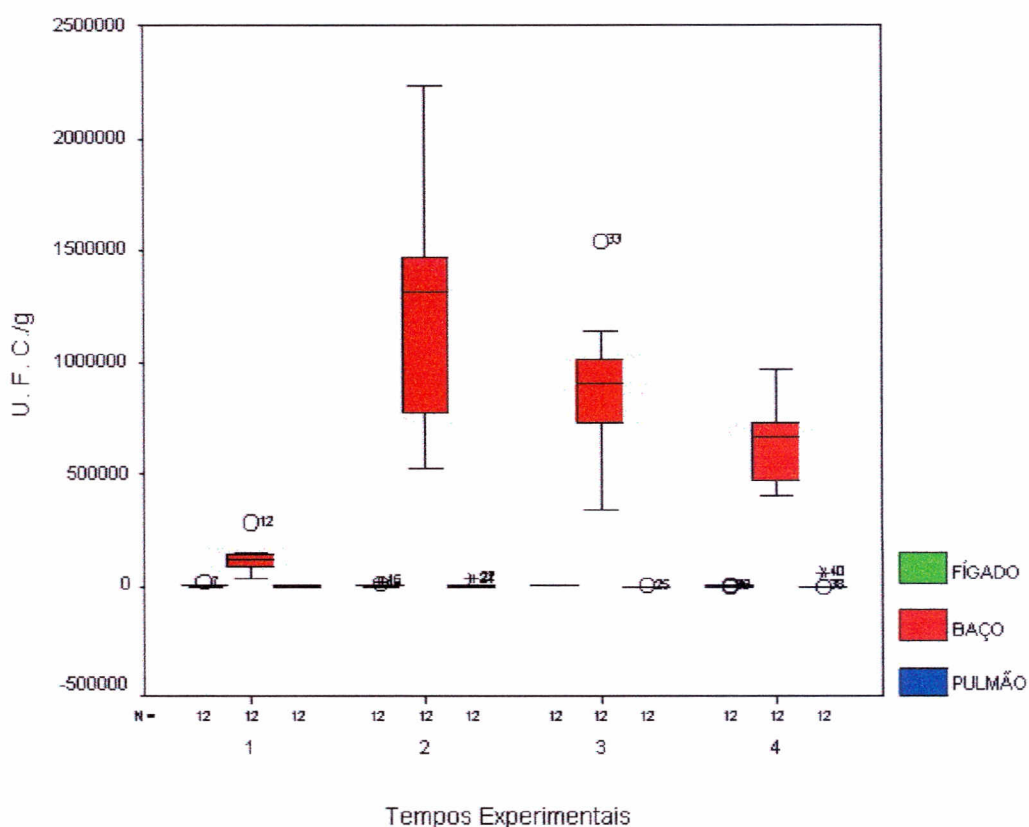
As contagens de U.F.C. consolidadas para as quatro estirpes e comparadas entre os órgãos para cada um dos tempos experimentais mostram que houve diferença entre elas (T1: $p < 0,001$; T2: $p < 0,001$; T3: $p < 0,001$ e T4: $p < 0,001$). A Tab. 6 mostra os resultados oriundos da comparação das contagens de U.F.C. entre órgãos para cada um dos tempos experimentais. O Graf. 13 ilustra esses resultados.

Tabela 6 - Valores de p^* referentes à comparação das contagens de U.F.C. de *Mycobacterium avium* entre órgãos de hamsters experimentalmente infectados – São Paulo – 2001

	Tempos experimentais em dia pós-inoculação							
	2		13		26		40	
Órgãos	fígado	pulmão	fígado	pulmão	fígado	pulmão	fígado	pulmão
baço	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
fígado	-	0,015	-	0,013	-	<0,001	-	0,001

* calculados pelo teste Mann Whitney com auxílio do programa SPSS 10.0

Gráfico 13 - Número de U.F.C. de *Mycobacterium avium* segundo órgãos e tempos experimentais. Hamsters inoculados pela via intra-peritoneal – São Paulo – 2001



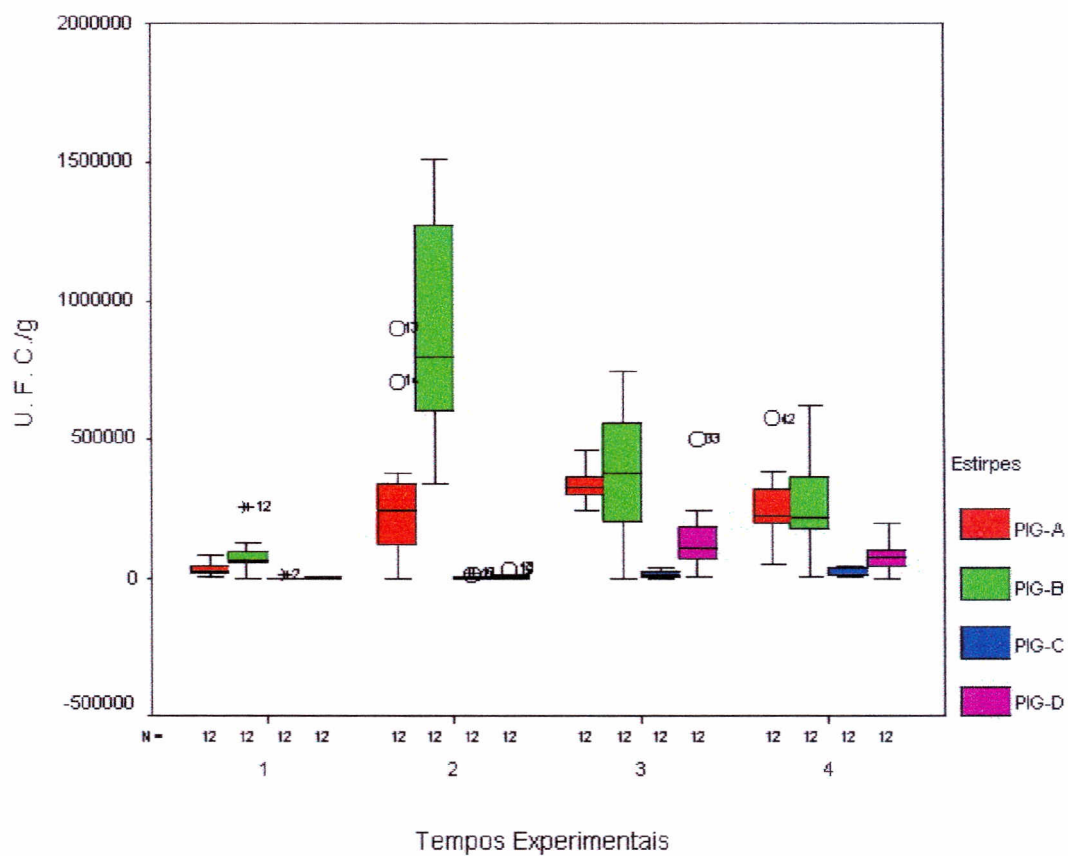
As contagens de U.F.C. consolidadas para os órgãos e comparadas entre quatro estirpes para cada um dos tempos experimentais mostram que houve diferença entre elas (T1: $p < 0,001$; T2: $p < 0,001$; T3: $p < 0,001$ e T4: $p < 0,001$). A Tab. 7 mostra os resultados oriundos da comparação das contagens de U.F.C. entre estirpes para cada um dos tempos experimentais. O Graf. 14 ilustra esses resultados.

Tabela 7 - Valores de p* referentes à comparação das contagens de U.F.C. entre as quatro estirpes de *Mycobacterium avium*, segundo os tempos experimentais. Hamsters inoculados pela via intra-peritoneal – São Paulo – 2001

Estirpe	Tempos experimentais em dias pós-inoculação											
	2			13			26			40		
	Pig-B	Pig-C	Pig-D	Pig-B	Pig-C	Pig-D	Pig-B	Pig-C	Pig-D	Pig-B	Pig-C	Pig-D
Pig-A	0,009	<0,001	<0,001	0,001	0,001	0,001	0,644	<0,001	0,001	0,686	<0,001	<0,001
Pig-B	-	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	-	0,005	0,018	-	<0,001	0,001
Pig-C	-	-	0,006	-	-	0,017	-	-	<0,001	□	-	0,003

*calculados pelo teste Mann Whitney com auxílio do programa SPSS 10.0

Gráfico 14 - Número de U.F.C. de *Mycobacterium avium* segundo estirpes e tempos experimentais. Hamsters inoculados pela via intra-peritoneal – São Paulo – 2001



DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Foram encontradas lesões granulomatosas no baço e fígado, nos quatro tempos experimentais, para as quatro estirpes, mostrando que todas foram capazes de produzir infecção em hamster. Aos dois dias pós-inoculação já foi possível constatar microscopicamente a presença de granulomas típicos no fígado (Fig. 5) e baço. Nos pulmões não foi constatada a presença de lesões granulomatosas em nenhum tempo experimental para nenhuma das quatro estirpes, embora tenha havido o isolamento das mesmas nesses órgãos, em todos os tempos, exceto no 3º e 4º para a estirpe PIG-C (Tabs. 2 a 5). Saliente-se que não foram realizados cortes seriados, o que ampliaria a chance de encontrar lesões. BALIAN et al. (1999) evidenciaram lesões granulomatosas em baço, fígado, linfonodo mesentérico e pulmões de hamsters inoculados oralmente com estirpe de MAC isolada de suíno do Estado de São Paulo.

O isolamento de MAC do sangue no primeiro tempo experimental justifica o seu encontro nos pulmões e sugere que a disseminação do agente ocorre precocemente pela via linfo-hemática. Apenas para a estirpe PIG-C não foi constatada a bacteremia, embora o agente tenha sido isolado dos pulmões nos dois primeiros tempos

experimentais (Tabs. 2 a 5). BALIAN et al. (1999) também constataram bacteremia dois dias pós-inoculação.

As comparações das contagens de U.F.C./g entre os tempos experimentais, para as quatro estirpes mostraram que estas multiplicaram-se nos três órgãos (Graf. 1-12). BERMUDEZ et al. (1989) após cinco inoculações em camundongos bege da dose 10^8 MAC/animal pela via oral de estirpes isoladas de pacientes aidéticos, observaram grande número de organismos viáveis em baço e fígado; mortalidade média de 26% e infecção disseminada em 100% dos animais após duas semanas. No presente experimento não houve mortalidade dos animais inoculados. Essa discrepância de resultados pode ser explicada pela diferença de estirpes e de modelo animal utilizado.

As contagens de U.F.C. consolidadas para as quatro estirpes e comparadas entre os órgãos para cada um dos tempos experimentais (Graf. 13), mostraram haver diferença entre os três órgãos, sendo que as quantidades de U.F.C./g foram sempre maiores no baço, seguido em ordem decrescente pelo fígado e pulmão (Tab. 6 e Graf. 13). Observando-se os Graf. de 1 a 12 e os resultados das contagens contidos nas Tabs. de 2 a 5, verifica-se que a partir de 13 dias pós-inoculação existe uma tendência de diminuição da quantidade de

bactérias recuperadas dos órgãos, sugerindo que as infecções produzidas pelas quatro estirpes são auto-limitantes. Estudos mais prolongados poderão responder esse questionamento que tem importantes implicações em eventuais mecanismos de transmissão horizontal.

As contagens de U.F.C./g consolidadas para os órgãos e comparadas entre as quatro estirpes para cada um dos tempos experimentais (Tab. 7 e Graf. 14), mostraram que as contagens de U.F.C./g de órgãos sempre foram maiores para as estirpes PIG-A e B quando comparadas àquelas verificadas para PIG-C e PIG-D. O mesmo se verifica para a estirpe PIG-D em relação à PIG-C. As únicas ocasiões onde não houve diferença nas contagens de U.F.C./g de órgãos foi no terceiro e quarto tempos experimentais, quando comparadas as estirpes PIG-A e B (Tab. 7), embora as medianas do Graf. 14 indiquem valores maiores para a PIG-B.

Esses resultados permitem dizer que as estirpes PIG-A e B apresentam uma capacidade de se multiplicar nos tecidos de hamsters maior que as PIG-C e D, e que a PIG-B, nos dois primeiros tempos experimentais apresentou essa mesma capacidade frente à PIG-A, o que significa diferentes capacidades de produzir infecção, ou seja, diferentes virulências. Portanto, relativamente à virulência foi

possível construir a seguinte escala: PIG-B > PIG-A > PIG-D > PIG-C. Se maior virulência for entendida como maior capacidade de difusão de um agente infeccioso não letal numa dada população, os dados obtidos no presente estudo explicam as freqüências de isolados obtidos de material de campo. Foram obtidos 27 isolados da estirpe Pig-B, oito da estirpe Pig-A e seis isolados para cada uma das estirpes Pig-C e D (Figs. 1-4). Importante dizer que o estudo dos isolados não foi planejado para a obtenção de freqüências.

Outros autores estudaram a virulência de micobactérias utilizando técnicas *in vitro*. MASLOW, et al., (1999) valeram-se da mensuração da hemólise e verificaram que a expressão da hemolisina pelo MAC parece ter um papel na patogênese da doença invasiva. LONG, et al., (2000) utilizando como modelo ovos embrionados de galinhas, observaram que estirpes de MAC isoladas de pacientes humanos causaram 20 a 90% de mortalidade quando os ovos foram infectados com a suspensão de bactérias.

Assim sendo, foi possível concluir que a diferenciação molecular de estirpes de MAC pela técnica de RFLP (VAN SOOLINGEN et al. 1998) está relacionada à característica fenotípica representada pela virulência. PAVLIK et al. (2000), estudando a relação entre a virulência e a presença da sequência de inserção IS901 em 165

estirpes de MAC virulentas para aves, caracterizadas por tuberculose generalizada, verificaram que 164 estirpes apresentavam IS901.

A estirpe PIG-B, por ter apresentado maior virulência, será empregada em estudos subseqüentes de transmissão horizontal em suínos.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

As estirpes PIG-A, B, C e D foram capazes de colonizar fígado, baço e pulmões de hamsters experimentalmente infectados.

As estirpes disseminaram-se pela via linfo-hemática. Apenas para a estirpe PIG-C não foi constatada a bacteremia.

O baço, quando comparado ao fígado e pulmão, é o órgão onde as estirpes multiplicam-se com maior intensidade.

A estirpe PIG-B é a que apresenta maior capacidade de se multiplicar nos tecidos de hamster, seguida pelas estirpes PIG-A, D e C.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS*

ACLAND, H. M.; WHITLOCK, R. H. *Mycobacterium avium* serotype 4 infection of swine: the attempted transmission by contact and the sequence of morphological changes in inoculated pigs, **Comparative Pathology**, v. 96, p. 246-266, 1986.

ALFREDESEN, S.; SKJERVE, E. An abattoir-based case-control study of risk factors for mycobacteriosis in Norwegian swine. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, n. 4, p. 253-259, 1993.

BALIAN, S. C.; RIBEIRO, P.; VASCONCELLOS, S. A.; PINEIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S.; GUERRA, J. L.; XAVIER, J. G.; MORAIS, Z. M.; TELLES, M. A. S. Linfadenites tuberculóides em suínos abatidos no Estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. **Revista de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (SP)**, v. 31, n. 4, p. 391-397, 1997.

BALIAN, S. C. **Infecção oral pelo complexo *Mycobacterium avium* (MAC) em hamster (*mesocricetus auratus*)**. Estudo bacteriológico e histológico. 1999. 53f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BERMUDEZ, L. E.; PETROFSKY, M.; KOLONOSKI, P. An animal model of *Mycobacterium avium* complex disseminated infection after colonization of the intestinal tract. **The Journal of Infections Diseases**, v. 165, n. 1, p. 75-79, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal – LANARA. **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. 2ª Revisão. Brasília: LANARA, 1991/1992, 136 p.

BROOKS, O. H. Observations on outbreaks of battey type mycobacteriosis in pigs raised on deep litter. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, p. 424-425, 1971.

* Conforme as diretrizes para a apresentação de dissertações e teses, 3ª. Ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2001. 56 p.

CAFREY, J. P. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n.1, p. 1-4, 1994.

CASTRO, A. F. P.; CAMPEDELLI FILHO, O.; WAISBICH, E. Opportunist mycobacteria isolated from the mesenteric lymph nodes of apparently healthy pigs in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 74-83, 1978.

CHARETTE, R.; MARTINEAU, G. P.; PIGEON, P.; TURCOTTE, C.; RIGGINS, R. An outbreak of granulomatous lymphadenitis due to *Mycobacterium avium* in swine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 30, n. 8, p. 675-678, 1989.

CLAPP, K. H. Tuberculosis-like lesions in swine in South Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 32, n. 4, p. 110-113, 1956.

CORRÊA, C. N. M.; CORRÊA, W. M. Micobactérias de bovinos e suínos em São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 205-208, 1973.

DEY, B. P.; PARHAM, G. L. Incidence and economics of tuberculosis in swine slaughtered from 1976 to 1988. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 203, n. 4, p. 516-519, 1993.

EVERITT, J.; ACLAND, H. M.; WHITLOCK, R. H. Mycobacterial infection in swine. **California Veterinarian**, v. 36, n. 3, p. 16-18, 1982.

GARDNER, I. A.; HIRD, D. W. Environmental source of mycobacteriosis in a California swine herd. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 33-37, 1989.

FALKINHAM, J. O. III Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical of Microbiology Review**, v. 9, p. 177-215, 1996.

FERREIRA NETO, J. S.; CORTES, J. A.; SINHORINI, I. L.; et al. A lesão tuberculóide macroscópica como critério diagnóstico da infecção micobacteriana em suínos abatidos em matadouro. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 26, n. 1, p. 21-33, 1989.

FERREIRA NETO, J. S.; PINHEIRO, S. R.; MORAIS, Z. M.; SINHORINI, I. L.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Avaliação quantitativa da concentração de micobactérias em órgãos e humores de hamster experimentalmente infectados com *Mycobacterium bovis*, estirpe AN 5. **Brazilian Journal of Veterinary research Animal Science**, v. 31, n. 2, p. 131-139, 1994.

GONTIJO FILHO, P. F.; NASCIMENTO, D.; FONSECA, L. S. Isolamento de micobactérias atípicas a partir de gânglios linfáticos de suínos. **Revista de Microbiologia**, v. 5, n. 3, p. 59-62, 1974.

HORSBURGH, JR., C. R. Epidemiology of *Mycobacterium avium* Complex disease. **American Journal Medicine**, v. 102, n. 5, p. 11-15, 1997.

INDERLIED, C. B. The *Mycobacterium avium* complex. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, n. 3, p. 266-310, 1993.

INDERLIED, C. B. Microbiology and Minimum Inhibitory Concentration Testing for *Mycobacterium avium* Complex Prophylaxis. **The American Journal of Medicine**, v. 102, p. 2-10, 1997.

JANETSCHKE, P. Uber die tuberculose beim schwein. **Monatshefte Veterinar Medizin**, v. 18, n. 20, p. 800, 1963.

LANGENEGGER, C. H.; LEITE, R. C.; LANGENEGGER, J.; RIBEIRAL, L. A. Linfadenites tuberculóides em suínos de abate da região de Brasília. **Pesquisa Agropecuária Brasileira. Série Veterinária**, v. 10, n. 8, p. 61-64, 1975.

LEÃO, S. C.; BRIONES, M. R.; SIRCILLI, M. P.; BALIAN, S. C.; MORÉS, N.; FERREIRA NETO, J. S. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants by PCR-Restriction Enzyme Analysis in Pig and human isolates from Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2592-2597, 1999.

LONG, E. G.; EWIN JR., E. P.; BARTLETT, J. H.; HORSBURGH JR., C. R.; BIRKNESS, K. A.; YAKRUS, M. A.; NEWMAN, G. W.; QUINN, F. D. Changes in the virulence of *Mycobacterium avium* after passage through embryonated hens' eggs. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, p. 267-272, 2000.

MARTINS, L. S. **Epidemiologia e controle de micobacterioses em suínos no sul do Brasil**: Estimativa do impacto econômico e estudo da sazonalidade. 2001, 51f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MASLOW, J. N.; DAWSON, D.; CARLIN, E. A.; HOLLAND, S. M. Hemolysin as a virulence factor for systemic infection with isolates of *Mycobacterium avium* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 445-446, 1999.

MEISSNER, G.; VIALIER, J.; COULLIoud, D. Identification serologique de 1.590 souches de *Mycobacterium avium* isolees en France et en Allemagne Federale. **Annual Microbiology**, v. 129A, p. 131-137, 1978.

MOTA, P. M. P. C.; LANGENEGGER, C. H.; LEITE, R. C.; LANGENEGGER, J. Micobactérias isoladas de suínos do Estado de Minas Gerais. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 29-33, 1980.

OLIVEIRA, S. J. Tuberculose em suínos. **A Hora Veterinária**, v. 9, n. 49, p. 31-36, 1989.

PAVLIK, I.; SVASTOVA, P.; BARTL, J.; DVORSKA, L.; RYCHLIK, I. Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans and the environment and virulence for poultry. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 2, p. 212-217, 2000.

PRITCHARD, W. D.; THOEN, C. O.; HIMES, E. M.; MUSCOPLAT, C. C.; JOHNSON, D. W. Epidemiology of mycobacterial lymphadenitis in an Idaho swine herd. **American Journal of Epidemiology**, v. 106, n.3, p. 222-227, 1977.

REDDY, V. M.; LUNA-HERRERA, J.; GANGADHARAM, P. R. J. Pathobiological significance of colony morphology in *Mycobacterium avium* complex. **Microbial Pathogenesis**, v. 21, p. 97-109, 1996.

REDDY, V. M. Mechanism of *Mycobacterium avium* complex pathogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 525-531, 1998.

- REIS, R. Controle da tuberculose em alguns países. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 17, p. 45-56, 1965.
- REZNIKOV, M.; LEGGO, J. H.; TUFFLEY, R. E. Further investigation of na outbreak of mycobacterial lymphadenitis at a deep-litter piggery. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 12, p. 622-623, 1971.
- REZNIKOV, M.; STRANGER, R. S.; LEGGO, J. H.; YOUNG, A. V. Mycobacterial lymphadenitis in pigs on the darking downs. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, n. 5, p. 264-265, 1973.
- SAITO, H.; TOMIOKA, H.; SATO, K.; TASAKA, H.; DAWSON, D. J. Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1694-1697, 1990.
- SONGER, J. G.; BICKNELL, E. J.; THOEN, C. O. Epidemiological Investigation of Swine Tuberculosis in Arizona. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v. 44, n. 1. p. 115-120, 1980.
- SZABO, I.; TUBOLY, S.; SZEKY, A.; KEREKES, J.; UDVARDY, N. Swine lymphadenitis due to *Mycobacterium avium* and atypical mycobacteria. II Studies on the role of littering in mycobacterial lymphadenitis incidence in large-scale pig units. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungariae**, v. 25, p. 77-83, 1975.
- SZAZADOS, I. Az atípuzos mycobacteriumkkal (*Mycobacterium avium*) fertőzöttsertéshús fogyasztásának egészségügyi kockázatáról. [Health hazards of pig meat with atypical mycobacterial infection (*Mycobacterium avium*)]. **Magyar – Ammatorvosok – lapja**, v. 48, n. 3, p. 170-171, 1993.
- TAMMEMAGI, L.; SIMMONS, G. C. Pathogenicity of *Mycobacterium intracellulare* to pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 7, p. 337-339, 1971.
- TAPARELLI, F.; MARZADORI, F. Observations on two outbreaks of tuberculosis in pigs diagnosed at slaughter. **Selezione Veterinaria**, v. 31, n. 9, p. 1133-1135, 1990.

THOEN, C. O.; JARNAGIN, J. L.; RICHARDS, W. D. Isolation and identification of mycobacteria from porcine tissues: a three years summary. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 9, p. 1383-1386, 1975.

THOEN, C. O.; KARLSON, A. G. Tuberculosis. In: LEMAN, A. D.; STROW, B.; GLOCK, R. D.; MENGELING, W. L.; PENNY, R. H. C.; SCHOLL, E. **Diseases of swine**. 6th ed., Ames, USA: Iowa State University Press, 1986. 930 p.

YACHIDA, S.; SHIMIZU, K. Studies on atypical mycobacteria isolated from tuberculous lesions of the mesenteric lymph nodes of slaughtered pigs. **Japanese Journal Veterinary Science**, v. 35, n. 6, p. 459-471, 1973.

YUGLI, H.; NEMOTO, H.; WATANABE, K. Sorotypes of *Mycobacterium intracellulare* of porcine origin. **National Institute of Animal Health Q**, Tokyo, v. 12, p. 168-169, 1972.

VAN SOOLINGEN, D.; BAUER, J.; RITACCO, V.; LEÃO, S. C.; PAVLIK, I.; VINCENT, V.; RASTOGI, N.; GORI, A.; BODMER, T.; GARZELLI, C.; GARCIA, M. J. IS 1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 3051-3054, 1998.