

ROSANA TABATA SUEHIRO

**Avaliação da virulência de isolados suínos de
Mycobacterium avium no Brasil caracterizados
pelo método de RFLP**

São Paulo

2008

ROSANA TABATA SUEHIRO

**Avaliação da virulência de isolados suínos de
Mycobacterium avium no Brasil caracterizados
pelo método de RFLP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2063
FMVZ

Suehiro, Rosana Tabata

Avaliação da virulência de isolados suínos de *Mycobacterium avium* no Brasil caracterizados pelo método de RFLP / Rosana Tabata Suehiro. – São Paulo : R. T. Suehiro, 2008.

59 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de Concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Virulência. 2. *Mycobacterium avium*. 3. Hamsters. 4. Infecção experimental. I. Título.




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da virulência de isolados suínos de *Mycobacterium avium* no Brasil caracterizados por RFLP", protocolo nº542/2004, utilizando 185 hamsters, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of virulence of swine *Mycobacterium avium* isolates, in Brazil, characterized by RFLP", protocol number 542/2004, utilizing 185 hamsters, under the responsibility of Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 09 de novembro de 2004


Prof.ª Dr.ª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP


Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

cada qual
pe silvio
arruda
17-11-2004

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SUEHIRO, Rosana Tabata

Título: Avaliação da virulência de isolados suínos de *Mycobacterium avium* no Brasil caracterizados pelo método de RFLP

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Profa. Dra. Eugenia Márcia de Deus Oliveira (*in memorian*),
a alma e o coração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto**, pela brilhante orientação, pela paciência e por me confiar a execução deste trabalho.

À técnica **Zenaide Maria de Moraes**, pelo auxílio durante a fase experimental, pelo apoio, amizade e dedicação constantes.

Ao **Prof. Dr. Fernando Ferreira** e ao **Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias**, pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao funcionário **Antonio da Costa Martins**, pelos cuidados com os animais do biotério.

À funcionária e sempre amiga **Sandra Abelardo Sanches**, pelo carinho, consideração, apoio e incentivo em todos os momentos de nossa convivência.

Aos companheiros de pós-graduação da FMVZ e de outras unidades da USP, pela amizade e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À **CAPES**, pela concessão temporária da bolsa de Doutorado.

RESUMO

RESUMO

SUEHIRO, R. T. **Avaliação da virulência de isolados suínos de *Mycobacterium avium* no Brasil caracterizados pelo método de RFLP.** [Evaluation of virulence of swine *Mycobacterium avium* isolates in Brazil characterized by RFLP method]. 2008. 60 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Dada a existência de quatro famílias molecularmente distintas de estirpes de *Mycobacterium avium* isoladas de suínos da região Sul do Brasil e a verificação de diferentes virulências em hamsters de um representante por família, o presente trabalho objetiva relacionar a virulência de isolados de *M. avium* aos seus perfis genéticos obtidos em experimentos de RFLP. Foram selecionados três representantes por família que foram inoculados pela via intraperitoneal em hamsters distribuídos em doze grupos (cada grupo recebeu uma estirpe diferente). Foi mantido um grupo controle que recebeu solução salina estéril pela mesma via. Após 16 dias da inoculação, os animais foram eutanasiados; os baços foram colhidos, pesados, macerados, suspensos em solução salina estéril e diluídos. Cada uma das diluições foi semeada em duplicata em placas com meio de Petragani, que foram incubadas a 37°C. Após 30 dias de incubação, foram realizadas as contagens de UFC e os resultados foram expressos em UFC de *M. avium* por grama de baço. As famílias genéticas apresentaram capacidade de virulência semelhante ($p=0,49$). As estirpes dentro das famílias PIG B e PIG D não apresentaram diferença na virulência ($p=0,15$ e $p=0,87$, respectivamente). Dentro da família PIG A, o isolado A52 foi mais virulento do que A1 e A162; a estirpe C122 se apresentou menos virulenta do que as estirpes C44 e C68 dentro da família PIG C. Independente das famílias, todos os isolados apresentaram diferenças na virulência. A estirpe A52 mostrou maior capacidade de virulência em relação às estirpes A1, A162, B72, C122, D242 e 243. Diferentes contagens de UFC significam diferentes capacidades de produzir infecção, ou seja, diferentes virulências. Concluiu-se que isolados de *M. avium* com diferentes perfis de RFLP podem apresentar diferentes virulências, independentemente de pertencerem a uma mesma família genética definida com base na similaridade dos padrões de RFLP; não houve diferença de virulência entre as quatro famílias genéticas de *M. avium* estruturadas com base na similaridade dos padrões de RFLP.

Palavras-chave: Virulência. *Mycobacterium avium*. Hamsters. Infecção experimental.

ABSTRACT

ABSTRACT

SUEHIRO, R. T. **Evaluation of virulence of swine *Mycobacterium avium* isolates in Brazil characterized by RFLP method.** [Avaliação da virulência de isolados suínos de *Mycobacterium avium* no Brasil caracterizados pelo método de RFLP]. 2008. 60 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Knowing the existence of four molecularly distinct families of *Mycobacterium avium* strains isolated from swine populations of Brazil Southern and the corroboration of diverse virulence in experimentally infected hamsters by one representative of each family, this work intend to establish relation between virulence of *M. avium* isolates and their genetic patterns obtained in prior RFLP analyses. We selected three representatives of each family, totalizing twelve strains, which were introduced by intraperitoneal route into hamsters distributed in twelve groups (each group received a different strain). A control group was maintained and received buffer solution by the same route. Sixteen days after the inoculation, animals were euthanized and their spleens were collected, weighted, triturated, suspended in buffer solution and then diluted. Two plates containing Petraghani medium were seeded with each dilution and were incubated at 37°C. At the 30th day, the CFU counting was performed and the results were expressed in *M. avium* CFU/g of spleen. All genetic families presented similar capacity of virulence ($p=0,49$). Strains of PIG B and PIG D families presented similar virulence within their families (respectively, $p=0,15$ and $p=0,87$). Inside the PIG A family, strain A52 was more virulent than strains A1 and A162; the strain C122 presented the lowest virulence compared with the strains C44 and C68 within the PIG C family. All strains, independent of their family, presented diverse virulence. Strain A52 was more virulent than strains A1, A162, B72, C122, D242 and D243. Distinct counting of CFU means different capacity of producing infection, i.e. diverse virulence. We concluded that, independent fo the genetic family established by similarity of RFLP patterns, *M. avium* isolates with diverse RFLP profiles may present different virulence; there was not difference in virulence; among all of four *M. avium* genetic families structured according to the similarity of RFLP patterns.

Keywords: Virulence. *Mycobacterium avium*. Hamsters. Experimental infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de <i>Mycobacterium avium</i> por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as famílias genéticas – São Paulo – 2005.....	40
Gráfico 2 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de <i>Mycobacterium avium</i> por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família PIG A – São Paulo – 2005.....	41
Gráfico 3 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de <i>Mycobacterium avium</i> por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família PIG B – São Paulo – 2005.....	42
Gráfico 4 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de <i>Mycobacterium avium</i> por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família PIG C – São Paulo – 2005.....	43
Gráfico 5 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de <i>Mycobacterium avium</i> por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família PIG D – São Paulo – 2005.....	44
Gráfico 6 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de <i>Mycobacterium avium</i> por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes – São Paulo – 2005.....	46

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Número de hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados experimentalmente pela via intraperitoneal, segundo os grupos experimentais compostos por famílias genéticas de *Mycobacterium avium* caracterizadas pela técnica de RFLP – São Paulo – 2005..... 36
- Tabela 2 - Tabela 1 - Número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as famílias genéticas e os isolados classificados pelo método de RFLP – São Paulo – 2005..... 39
...
- Tabela 3 - Valores de p para a comparação do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família genética FIG A – São Paulo – 2005..... 41
- Tabela 4 - Valores de p para a comparação do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família genética FIG C – São Paulo – 2005..... 43
- Tabela 5 - Valores de p para a comparação do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes – São Paulo – 2005..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7H9	meio líquido para cultivo de micobactérias (DIFCO – Detroit, EUA)
µL	microlitro
µm	micrômetro
<i>ad libitum</i>	à vontade
AIDS	síndrome da imunodeficiência humana
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
BCG	bacilo de Calmette-Guérin
CO₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
d.p.i.	dias pós infecção
et al.	e colaboradores
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IS	seqüência de inserção
LRF	análise do fragmento de restrição longo
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MAC	complexo <i>Mycobacterium avium</i>
mg	miligrama
mL	mililitro
MNT	micobactéria não-tuberculosa
MTB	complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	cloreto de sódio
NK	<i>natural killer</i>
OADC	ácido oléico-albumina-dextrose-catalase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>pulsed-field gel electrophoresis</i>
PRA	<i>PCR-restriction analysis</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	ácido ribonucléico
SSE	solução salina estéril

TNF	fator de necrose tumoral
UFC	unidade formadora de colônia
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
<	menor que
>	maior que
=	igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	AGENTE INFECTANTE.....	34
3.2	ANIMAIS.....	34
3.3	PREPARAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE (OLIVEIRA et al., 2002).....	35
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
3.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	37
4	RESULTADOS	39
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	54

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As micobactérias, bactérias do gênero *Mycobacterium*, são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), de crescimento lento (GYLES; THOEN, 1986; TIMONEY et al., 1988; INDERLIED et al., 1993; FALKINHAM III, 1996), com 0,2 a 0,7 µm de largura e um a 10 µm de comprimento, aeróbios, imóveis, não esporulados (HOLT et al., 1994) e não pigmentados que têm crescimento otimizado em pH 5 a 5,5 em microaerofilia, em águas salobras ou não (FALKINHAM III, 1996) e são intrinsecamente resistentes a drogas (INDERLIED et al., 1993; REDDY, 1998; CANGELOSI et al., 2001; COSMA et al., 2003) e a vários desinfetantes químicos (EVERITT et al., 1982).

O gênero *Mycobacterium*, pertencente à ordem dos Actinomycetales, subordem Corynebacteriaceae, família Mycobacteriaceae (SHINNICK; GOOD, 1994), é formado por espécies altamente patogênicas que compõem o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e por espécies de bactérias ambientais, apatogênicas em sua maioria, denominadas micobactérias não-tuberculosas (COSMA et al., 2003; UEKI et al., 2005).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) compreende as espécies estreitamente relacionadas *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* (COSMA et al., 2003; CHIMARA et al., 2004), *M. bovis* subespécie *bovis*, estirpe vacinal *M. bovis* BCG (RICHTER et al., 2003; CHIMARA et al., 2004).

O homem é susceptível à tuberculose principalmente por *M. tuberculosis* (COSIVI et al., 1998; BOLIN et al., 1997; USDA, 1997) e *M. bovis* (COSIVI et al., 1998; CHIMARA et al., 2004), que são clinicamente indistinguíveis (COSIVI et al., 1998; COSMA et al., 2003) e cujas lesões apresentam padrão histológico semelhante, diferindo apenas na distribuição nos tecidos (USDA, 1997). No passado, a tuberculose era causada principalmente por *M. bovis*, adquirida por ingestão de leite cru, e se tornou mais rara após a introdução da pasteurização (USDA, 1997). As lesões localizam-se, na maioria das vezes, nos linfonodos cervicais e mesentéricos, mas também podem surgir nos pulmões (BOLIN et al., 1997). O homem infecta-se com *M. tuberculosis* através de aerossóis expelidos por indivíduo doente. A doença caracteriza-se por infecção pulmonar ou pneumonia, cujos sintomas são febre, tosse (às vezes, com sangue), sudorese noturna e perda de peso. A progressão da doença resulta em piora dos sintomas e dispnéia, e a falta de tratamento pode levar o indivíduo a óbito (USDA, 1997).

Assim como o homem, os animais também são susceptíveis às infecções tuberculosas, apresentando os mesmos padrões de doença. *M. bovis* normalmente infecta bovinos adultos

(USDA, 1997) e outros animais de importância econômica, refletindo em grandes perdas para a agropecuária (GUTIÉRREZ et al., 1995; USDA, 1997). Pode também acometer ampla gama de animais silvestres, que mantêm o ciclo da tuberculose na natureza e servem como fonte de infecção para os animais domésticos (ARANAZ et al., 2004).

As micobactérias não-tuberculosas (MNT) podem ser consideradas ubiqüitárias, pois já foram isoladas de várias fontes ambientais, incluindo solo, plantas, aerossóis (INDERLIED et al., 1993; ROIZ et al., 1995; FALKINHAM III, 1996; REDDY, 1998; COVERT et al., 1999; COSMA et al., 2003) e sistemas de distribuição de água potável em todo o mundo (FALKINHAM III, 1996; COVERT et al., 1999). São patógenos oportunistas e emergentes capazes de causar uma grande variedade de doenças no homem e nos animais (GYLES; THOEN, 1986; INDERLIED et al., 1993; ROIZ et al., 1995; FALKINHAM III, 1996; KOIVULA et al., 2004; UEKI et al., 2005).

Com mais de cem espécies descritas (UEKI et al., 2005), as MNT contemplam as micobactérias que não fazem parte do MTB (FALKINHAM III, 1996; COVERT et al., 1999), entre as quais se encontra o complexo *Mycobacterium avium* (MAC), um grupo de micobactérias ambientais aparentadas que inclui *M. avium* subespécies *avium*, *paratuberculosis* e *silvaticum*, e *M. intracellulare* (VAN SOOLINGEN et al., 1998; COSMA et al., 2003), sendo que os sorovares 1 a 6, 8 a 11 e 21 pertencem à espécie *M. avium*; 7, 12 a 20 e 25 à *M. intracellulare*; e 22 a 24 e 26 a 28, respectivamente às espécies *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* (SAITO et al., 1990).

A incidência das micobacterioses humanas - infecções causadas pelas MNT - aumentou rapidamente após a emergência da AIDS (síndrome da imunodeficiência humana) em todo o mundo, no início da década de 1980 (INDERLIED et al., 1993; FALKINHAM III, 1996; REDDY, 1998; VAN SOOLINGEN et al., 1998; UEKI et al., 2005). Em países desenvolvidos, a incidência de tuberculose é baixa, mas a de infecções não tuberculosas é elevada em pacientes infectados pelo HIV (FALKINHAM III, 1996; REDDY, 1998; KOIVULA et al., 2004), enquanto que, nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, a incidência de tuberculose é alta, e a de micobacterioses em pacientes infectados pelo HIV é baixa, provavelmente por virem a óbito por outras causas antes de desenvolverem a doença por *M. avium*, principal agente etiológico nesses indivíduos (FALKINHAM III, 1996).

Microrganismos do MAC têm sido responsabilizados pela doença clínica por micobactérias atípicas no homem (McFADDEN et al., 1987), por linfadenites em crianças (FALKINHAM III, 1996; NICHOLS et al., 2004), por infecção respiratória em idosos, por doença disseminada, respiratória e intestinal em pacientes HIV (vírus da imunodeficiência

humana) positivos (NICHOLS et al., 2004), e infecções pulmonares, cutâneas, articulares e ósseas em indivíduos imunocomprometidos (FALKINHAM III, 1996). As estirpes mais freqüentemente isoladas do homem são *M. avium* subespécie *avium* e *M. intracellulare* (COSMA et al., 2003).

Microrganismos do MAC causam infecções em grande escala em vários animais, incluindo búfalos, bovinos, suínos, cervídeos, eqüinos, cães, gatos e algumas espécies de macacos (FALKINHAM et al., 2004). *M. avium* subespécies *silvaticum* e *avium* são responsáveis principalmente por tuberculose nas aves (ACHA; SZYFRES, 1986; McFADDEN et al., 1987; O'GRADY et al., 2000) e outros animais (McFADDEN et al., 1987; O'GRADY et al., 2000). As linfadenites granulomatosas associadas à subespécie *avium* (ACHA; SZYFRES, 1986; COSMA et al., 2003), principalmente nos suínos, restringem-se aos linfonodos localizados ao longo do trato digestivo, sendo assintomáticas e detectadas somente no momento do abate pelo serviço de inspeção de carnes (EVERITT et al., 1982; ACLAND; WHITLOCK, 1986; SILVA et al., 2000; COSMA et al., 2003; FALKINHAM et al., 2004).

A infecção por MAC resulta da deficiência de mecanismos imunológicos do hospedeiro associada aos fatores de virulência desses microrganismos (INDERLIED, 1997). Entre alguns dos fatores de virulência potenciais estão o tipo de colônia, inibição da acidificação de vesículas fagocíticas, inibição da fusão fagossomo-lisossomo, retardo na secreção do fator de necrose tumoral pelas células hospedeiras infectadas, captura pelos enterócitos, produção de receptores para macrófagos e replicação no interior dos mesmos (FALKINHAM III, 1996), adesão e invasão de células epiteliais (INDERLIED, 1997; REDDY, 1998).

Pouco se conhece sobre os mecanismos pelos quais *M. avium* sobrevive em um hospedeiro, mas sabe-se que macrófagos e monócitos são preferencialmente infectados por esse microrganismo. Uma vez fagocitado pelos macrófagos, o *M. avium* inibe a acidificação do fagossomo e, subseqüentemente, a fusão fagossomo-lisossomo, que são mecanismos associados à morte intracelular de microrganismos. Micobactérias apatogênicas não conseguem inibir esses mecanismos e são inativadas no interior dos macrófagos (LI et al., 2005).

O fator de necrose tumoral (TNF), uma citocina produzida por macrófagos e monócitos que também pode ser produzida por outras células (células B, T, NK, da glia e adipócitos), afeta a função de muitos tipos de células e media a inflamação e a resposta imune celular. Apresenta importante papel na regulação da atividade microbicida dos macrófagos

contra diversos microrganismos, inclusive *M. avium* e outras micobactérias (SARMENTO; APPELBERG, 1995). A ação sobre a produção de TNF pelos macrófagos derivados de medula óssea influencia na virulência de estirpes de *M. avium*. Micobactérias não virulentas induzem produção *in vitro* de TNF pelos macrófagos derivados de medula óssea antes das estirpes virulentas e, portanto, têm seu crescimento prejudicado (FURNEY et al., 1992).

O homem e os suínos apresentam características semelhantes de resistência e susceptibilidade a micobactérias virulentas, e desenvolvem lesões com padrão histopatológico similar, motivos pelos quais o suíno é utilizado como modelo de virulência e doença para micobacterioses humanas (BOLIN et al., 1997). Para avaliação ou determinação da virulência *in vivo* de isolados de *M. avium*, os murinos são amplamente utilizados, sendo o mais difundido o modelo com camundongo Beige (INDERLIED et al., 1993; GANGADHARAM, 1995; FLÓRIDO et al., 1997), além de outros modelos, como ensaios em ovo de galinha embrionado (LONG et al., 2000), camundongo mutante C57BL/6 (APPELBERG et al., 1995; COSMA et al., 2003), camundongo BALB/c (PEDROSA et al., 1994), hamsters (YANGCO et al., 1989; OLIVEIRA et al., 2002).

Há propostas de se estabelecer relação entre a virulência e a característica das colônias de MAC em meio sólido (REDDY, 1998). A variação reversível e transitória na morfologia das colônias de *M. avium* tem importância significativa para a virulência, patogenia e susceptibilidade a antibióticos desses microrganismos (REDDY et al., 1996). As variantes lisas opacas normalmente são isoladas do ambiente e crescem bem em meios de cultura (REDDY et al., 1996; CANGELOSI et al., 2001); as lisas transparentes, mais virulentas que as lisas opacas (REDDY et al., 1996; REDDY, 1998; CANGELOSI et al., 2001), predominam em amostras clínicas, crescem melhor em macrófagos e modelos animais (CANGELOSI et al., 2001), colonizam eficientemente as mucosas, aderem facilmente às células epiteliais e são mais resistentes aos antibióticos (REDDY et al., 1996; REDDY, 1998; CANGELOSI et al., 2001); as intermediárias podem sobreviver e prosperar sob condições adversas. As variantes rugosas podem surgir após passagem *in vitro*, mas são desconhecidas as condições que favorecem seu crescimento (CANGELOSI et al., 2001).

Com a necessidade de se identificar o agente patogênico para a instituição de medidas quimioterápicas e de saúde pública voltadas (FALKINHAM III, 1996) às fontes de infecção e às vias de transmissão (GARRIGA et al., 2000), houve o desenvolvimento de métodos rápidos para isolamento e identificação das MNT. Métodos para tipificação micobacteriana, como soro, fago e biotipagem são demorados, pouco sensíveis e de utilidade limitada (FALKINHAM III, 1996). A diferenciação das espécies de micobactérias através de testes

bioquímicos e fenotípicos é demorada devido à lenta taxa de crescimento das mesmas, e os resultados podem variar muito conforme as condições de crescimento, podendo ser até inacurados (COVERT et al., 1999).

Devido a essas limitações e direcionados para estudos epidemiológicos das MNT, foram desenvolvidos métodos de tipagem baseados em eletroforese enzimática e na análise do DNA (que não considera a variação na expressão fenotípica), tais como análise de fragmento de restrição longo (LRF) envolvendo PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) (ROIZ et al., 1995; VAN SOOLINGEN et al., 1998), PCR (*polymerase chain reaction*) e análise do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) de DNA cromossômico (VAN SOOLINGEN et al., 1998). Esses métodos examinam uma molécula estável que esteja presente em todos os isolados, e embora sejam conceitualmente simples, requerem equipamentos e técnicas sofisticadas de biologia molecular. A identificação por provas de ácido nucléico é rápida, mas requer várias análises e identifica apenas algumas espécies de micobactérias (COVERT et al., 1999). As provas de DNA baseadas na seqüência gênica de RNA ribossômico podem ser usadas para identificar microrganismos do MAC e os sorotipos reagentes com estirpes específicas (McFADDEN et al., 1987; FALKINHAM III, 1996). O seqüenciamento direto do gene 16S de RNA ribossômico é um método rápido e acurado com grande poder discriminatório e amplamente utilizado para identificar e classificar diferentes espécies dentro do gênero *Mycobacterium*. Os genes que codificam a região 16S são estáveis e espécie-específicos, e os isolados também podem ser identificados e diferenciados pelas seqüências DT1 e DT6 por PCR (SIRCILI et al., 1998; COVERT et al., 1999; KOIVULA et al., 2004).

As técnicas de RFLP permitem distinguir isolados do MAC através do uso de endonucleases com sítios de restrição freqüentes ou não e separação de grandes fragmentos de DNA (INDERLIED et al., 1993). As seqüências de inserção, utilizadas nas técnicas de RFLP, muito úteis em estudos epidemiológicos, filogenéticos e taxonômicos (GUERRERO et al., 1995; ROIZ et al., 1995; VAN SOOLINGEN et al., 1998), têm sido empregadas para microrganismos do MAC, como IS900 para identificação de *M. avium* subespécie *paratuberculosis* (GUERRERO et al., 1995; ROIZ et al., 1995; VAN SOOLINGEN et al., 1998; O'GRADY et al., 2000), IS901 e IS1110 para *M. avium* (GUERRERO et al., 1995), e IS1141 para *M. intracellulare* (GUERRERO et al., 1995; VAN SOOLINGEN et al., 1998). IS901 e IS902 compartilham 98% de homologia no DNA de *M. avium* (ROIZ et al., 1995; VAN SOOLINGEN et al., 1998). Três seqüências de inserção se mostram promissoras em estudos epidemiológicos de *M. avium*, quais sejam IS1110, IS1245 e IS1311 (ROIZ et al.,

1995; FALKINHAM III, 1996). As duas últimas compartilham 85% de similaridade no DNA (ROIZ et al., 1995; FALKINHAM III, 1996; PESTEL-CARON; ARBEIT, 1998; O'GRADY et al., 2000).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Sircili (1999) isolou amostras de micobactérias de suínos da região sul do Brasil, que foram submetidas a exames de identificação através de PRA (*PCR-restriction analysis*), amplificação de DT1, DT6, IS1245 e IS1311, e identificação bioquímica. Os isolados identificados como *M. avium* passaram por caracterização molecular através de experimentos de RFLP com a seqüência de inserção IS1245, que revelaram a existência de quatro agrupamentos com padrões similares de número de bandas e distintos entre si, denominando-os de famílias PIG A, PIG B, PIG C e PIG D.

Oliveira et al. (2002) selecionou um representante de cada família com o intuito de verificar a virulência desses representantes em hamsters, através da inoculação pela via intraperitoneal e posterior quantificação do agente em vários órgãos e no sangue. O baço apresentou as maiores contagens de UFC (unidades formadoras de colônia), seguido pelo fígado e pulmões. As análises das contagens de UFC de baço constataram diferenças entre as estirpes e permitiram a construção de escala de virulência (PIG B>PIG A>PIG D>PIG C). Como as famílias genéticas foram organizadas com base na semelhança dos padrões de RFLP, e Oliveira et al. (2002) utilizou apenas um isolado por família, não foi possível concluir se a diferença de virulência foi uma característica associada ao perfil específico de RFLP ou à família genética na qual tal perfil estava inserido.

Assim, o presente estudo teve por objetivo ampliar o experimento realizado por Oliveira et al. (2002), ensaiando um número maior de isolados por família genética. Dessa forma, foram testados três isolados por família genética, naturalmente com perfis de RFLP semelhantes, porém distintos. O modelo escolhido foi o mesmo utilizado por Oliveira et al. (2002), porém optou-se pela quantificação apenas em baço, pois foi órgão onde esses autores verificaram a maior multiplicação de *M. avium*. A metodologia empregada foi aquela descrita por Ferreira Neto et al. (1994) e Balian et al. (1997) e também utilizada por Oliveira et al. (2002).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AGENTE INFECTANTE

Foram utilizados isolados de *Mycobacterium avium* obtidos de lesões granulomatosas de carcaças de suínos condenadas por linfadenite granulomatosa em abatedouros da Região Sul do Brasil. Esses isolados foram organizados em quatro padrões molecularmente semelhantes através da técnica de RFLP, quais sejam, Famílias PIG-A, B, C e D (SIRCILI, 1999). Para o presente estudo, foram selecionados três isolados de cada uma dessas quatro famílias: isolados 1, 52 e 162 da Família PIG-A; isolados 61, 72 e 104 da Família PIG-B; isolados 44, 68 e 122 da Família PIG-C e isolados 116, 242 e 243 da Família PIG-D.

Cada uma dessas estirpes vinha sendo mantida em laboratório através de repiques sucessivos em meios sólidos de Petragani.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 172 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas jovens, com 70 a 160 gramas de peso vivo, oriundos do biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), sendo 24 destinados à preparação do inóculo infectante e 148 ao delineamento experimental. Os animais foram mantidos no infectório do mesmo departamento em caixas com cama de maravalha, trocada duas vezes por semana, e alimentados com ração comercial peletizada e água da rede pública fornecidos *ad libitum*. No máximo, foram alojados seis animais por caixa, sempre do mesmo sexo.

3.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE (OLIVEIRA et al., 2002)

Para cada uma das estirpes estudadas foi feita uma suspensão em solução salina fisiológica estéril a 0,85% de NaCl (SSE) contendo 2mg/mL de micobactérias, da qual 0,5mL foi administrado intraperitonealmente em dois hamsters. Após 15 dias da inoculação, os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO₂) e, em seguida, imersos em solução a 1/30 de hipoclorito de sódio por 15 minutos para descontaminação das carcaças e necropsiados para retirada do baço, que foi destinado ao cultivo de micobactérias em tubos contendo meio de Petraghani e incubados em estufa a 37°C por 30 dias. O baço foi o órgão de eleição por apresentar maior índice de crescimento micobacteriano nos trabalhos realizados por Oliveira et al. (2002).

As estirpes reisoladas de baço foram passadas para o meio líquido 7H9 enriquecido com OADC e incubadas em estufa a 37°C para obtenção de crescimento ótimo. Após sete dias de incubação, 10µL do cultivo foram diluídos em tubos contendo 10mL de meio líquido 7H9 enriquecido com OADC e incubados em estufa a 37°C por mais dois dias. Após adição de SSE para obtenção de uma concentração de 10⁹ bactérias/mL (escala MacFarland), os inóculos foram distribuídos em *ependorfs* no volume de 1mL e congelados em *freezer* a -80°C.

Após duas semanas, procedeu-se ao descongelamento gradativo de um *ependorf* por estirpe e diluiu-se seriadamente na razão 10. De cada diluição, semearam-se, em duplicata, 50µL em placa de Petri contendo meio de Petraghani. Após 30 dias de incubação em estufa a 37°C, contaram-se as unidades formadoras de colônia (UFC).

Dessa forma foi possível quantificar o número de UFC de *M. avium* de cada um dos inóculos preparados com os diferentes isolados do agente e, a partir dos *ependorfs* congelados remanescentes, confeccionar inóculos para os grupos experimentais de forma a garantir que cada hamster recebesse a dose de 30.000 UFC de micobactérias pela via intraperitoneal. Imediatamente após a preparação dos inóculos infectantes, foi feito um controle da viabilidade dos mesmos pela semeadura em placas contendo meio de Petraghani e incubação em estufa a 37°C por 15 dias.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram formados quatro grupos experimentais, cada qual composto por três subgrupos, e um grupo controle. Os grupos experimentais foram homogeneizados quanto ao peso e ao sexo e posteriormente desafiados pela via intraperitoneal com isolados de *M. avium*. O grupo controle recebeu, pela mesma via, apenas o veículo do inóculo, ou seja, solução salina estéril (SSE). A tabela 1 traz os detalhes da formação dos grupos.

Tabela 2 - Número de hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados experimentalmente pela via intraperitoneal, segundo os grupos experimentais compostos por famílias genéticas de *Mycobacterium avium* caracterizadas pela técnica de RFLP – São Paulo – 2005

Grupo experimental / Família genética	Número do isolado	Número de hamsters inoculados
PIG-A	1	12
	52	12
	162	12
PIG-B	61	12
	72	12
	104	12
PIG-C	44	12
	68	12
	122	12
PIG-D	116	12
	242	12
	243	12
Controle	veículo do inóculo	4
Total		148

Para melhorar a operacionalidade, os grupos foram inoculados em datas diferentes. Aos 16 dias após a inoculação, os animais de cada um dos grupos experimentais foram eutanasiados, juntamente com um animal controle. A eutanásia foi feita em câmara de CO₂. Os animais foram, então, imersos em solução de hipoclorito de sódio (1/30) por 15 minutos

para descontaminação externa e, em seguida, necropsiados com material estéril para a retirada do baço, que foi processado para a quantificação de *M. avium* através de cultivo em meio sólido. A escolha do baço e do intervalo de tempo transcorrido da inoculação até a eutanásia foi feita em função dos resultados obtidos por Oliveira et al. (2002). Esses autores verificaram que as maiores contagens de UFC de *M. avium* por grama de órgão de hamster inoculado intraperitonealmente foram obtidas de baço após 13 dias do desafio.

O baço de cada animal foi pesado e triturado em gral com pistilo estéreis, sendo acrescida SSE para obtenção de 10mL de suspensão (diluição inicial), da qual foi obtida outra diluição na razão dez. Para cada uma das diluições, 100µL foram semeados em duplicatas em placas de Petri contendo meio de Petragnani que foram incubadas em estufa a 37°C com observação semanal. A contagem do número de UFC foi realizada após 30 dias de incubação.

Os resultados das contagens, expressos em número de UFC de *Mycobacterium avium* por grama de baço, foram obtidos pela média aritmética das duas placas da maior diluição em que houve crescimento de colônias.

3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para as comparações dos números de UFC/g de baço entre as famílias, entre as estirpes dentro de cada família e entre as estirpes, foi utilizado o teste não paramétrico para comparações múltiplas de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para verificar onde se deu a diferença na comparação dois a dois.

4 RESULTADOS

Durante todo o experimento o estado geral dos animais permaneceu bom e não foi constatado, em momento algum, sinais como perda do apetite, prostração ou perda de peso.

Em nenhuma oportunidade foi observada a mortalidade de animais inoculados ou a presença de lesões macroscópicas nos órgãos dos mesmos no momento da necropsia.

Houve crescimento de micobactérias em todas as placas contendo meio de Petragani utilizadas para controle de viabilidade dos inóculos, e não foi observado crescimento desses microrganismos nas placas inoculadas com suspensão de baço dos animais controles.

Na tabela 2, os resultados observados referem-se às contagens de UFC de *Mycobacterium avium* por grama de baço para as várias estirpes estudadas.

Tabela 3 - Número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as famílias genéticas e os isolados classificados pelo método de RFLP – São Paulo – 2005

	Famílias genéticas de <i>Mycobacterium avium</i>											
	PIG A			PIG B			PIG C			PIG D		
	Isolados Animais	A1	A52	A162	B61	B72	B104	C44	C68	C122	D116	D242
1	500	48	0	4684	0	0	6	4	0	4250	24	5
2	0	2390	0	125	0	0	60	44	0	0	8	12
3	0	0	33	69	0	61	551	59	0	70	0	0
4	3	2759	36	0	106	11	40	47	0	5	39	0
5	5	346	0	0	4	0	51	255	0	0	0	22
6	0	1957	94	196	0	0	38	40	0	8	0	0
7	0	221	3	0	0	0	48	17	4	0	0	73
8	11	200	14	1888	0	0	128	0	0	32	0	30
9	3	399	0	0	20	957	96	327	0	42	0	20
10	4	136	0	150	12	32	0	26	0	0	60	2
11	9	481	895	4	44	63	265	0	0	380	64	24
12	0	412	3	1667	29	32	118	0	0	0	186	0
Medianas dos isolados	3	373	3	97	2	5	56	33	0	7	4	9
Medianas das famílias		12,5			8			11,5			6,5	

A comparação entre as contagens de UFC de *Mycobacterium avium* por grama de baço das famílias genéticas diferenciadas pela técnica de RFLP mostrou não haver diferença entre elas (KRUSKAL-WALLIS: $p=0,491$). O gráfico 1 ilustra as medianas e o 1º e 3º quartis dessas contagens obtidas para cada uma das famílias genéticas estudadas.

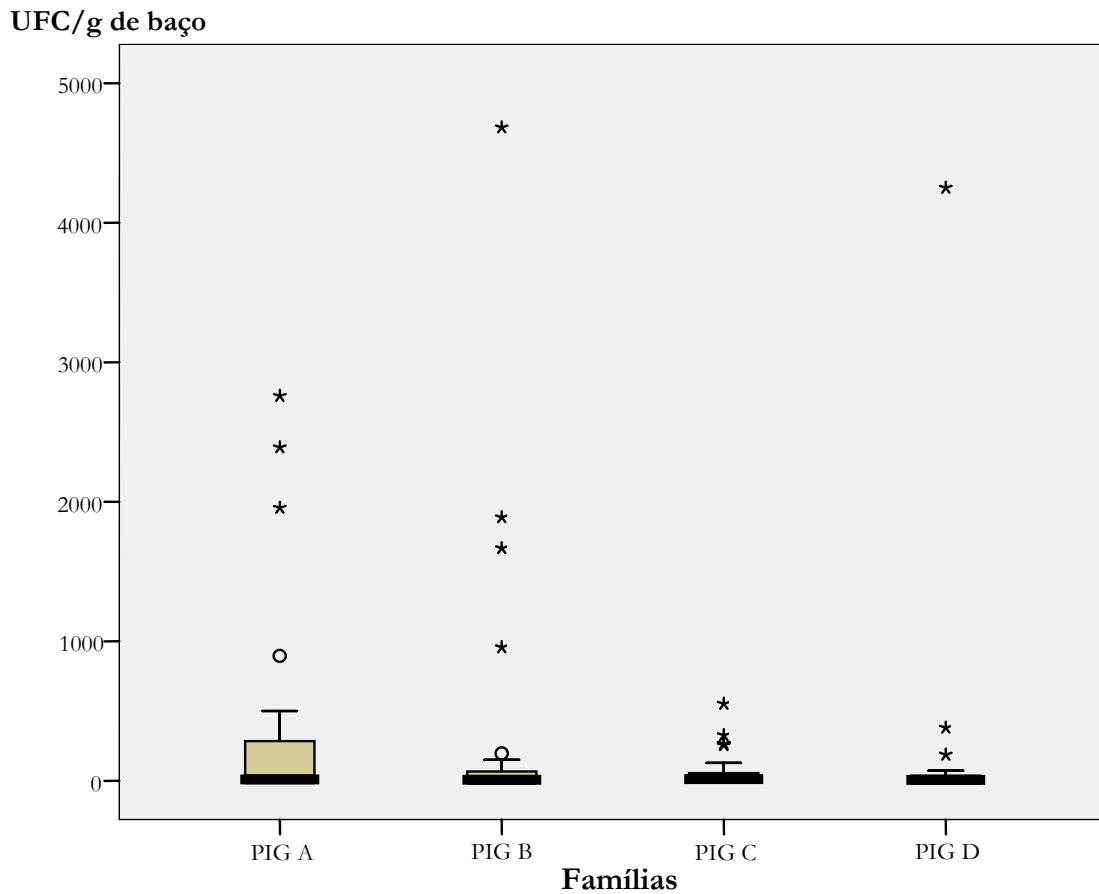


Gráfico 1 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as famílias genéticas – São Paulo – 2005

Para a família PIG A, houve diferença entre as contagens de UFC de *M. avium* por grama de baço das estirpes A1, A52 e A162 (KRUSKAL-WALLIS: $p=0,001$). Os resultados do pós-teste de Dunn constam da tabela 3 e o gráfico 2 ilustra a mediana e o 1° e 3° quartis verificadas para cada uma dessas estirpes.

Tabela 3 - Valores de p para a comparação do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família genética PIG A – São Paulo – 2005

Estirpes	A1	A52
A52	0,002	-
A162	0,529	0,002

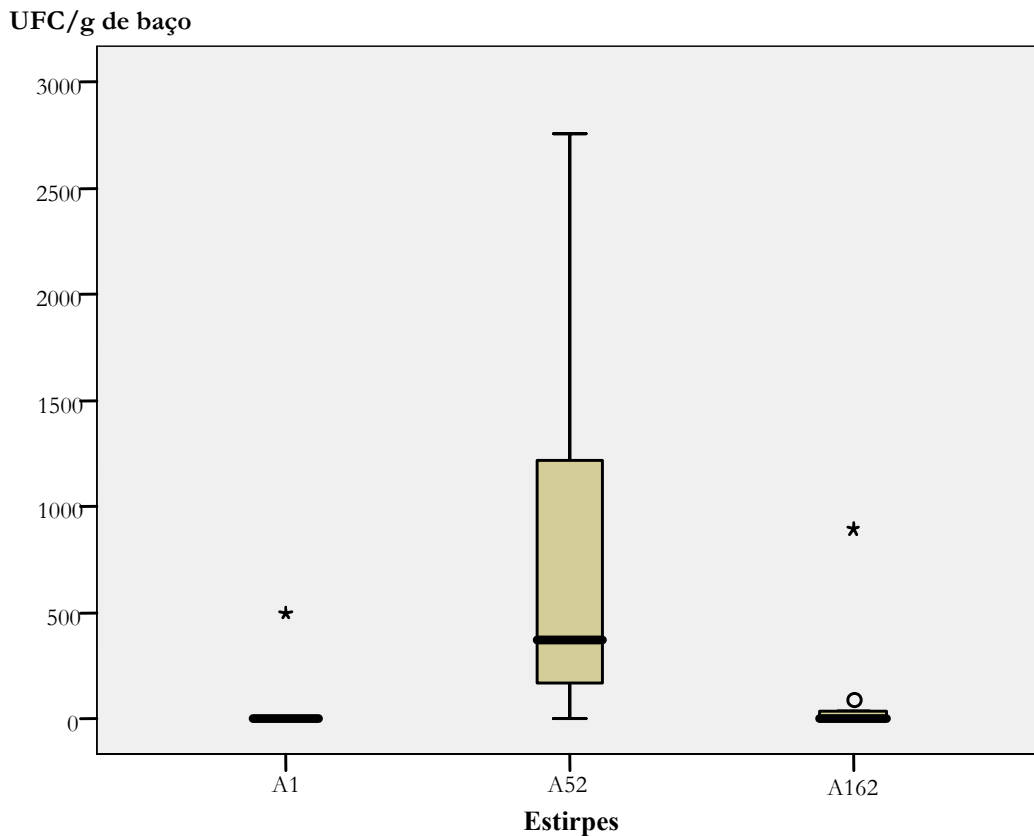


Gráfico 2 - Mediana e 1° e 3° quartis do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família genética PIG A – São Paulo – 2005

Para a família PIG B, não houve diferença entre as contagens de UFC de *M. avium* por grama de baço das estirpes B61, B72 e B104 (KRUSKAL-WALLIS: $p=0,15$). O gráfico 3 ilustra a mediana e o 1º e 3º quartis observados para cada uma dessas estirpes.

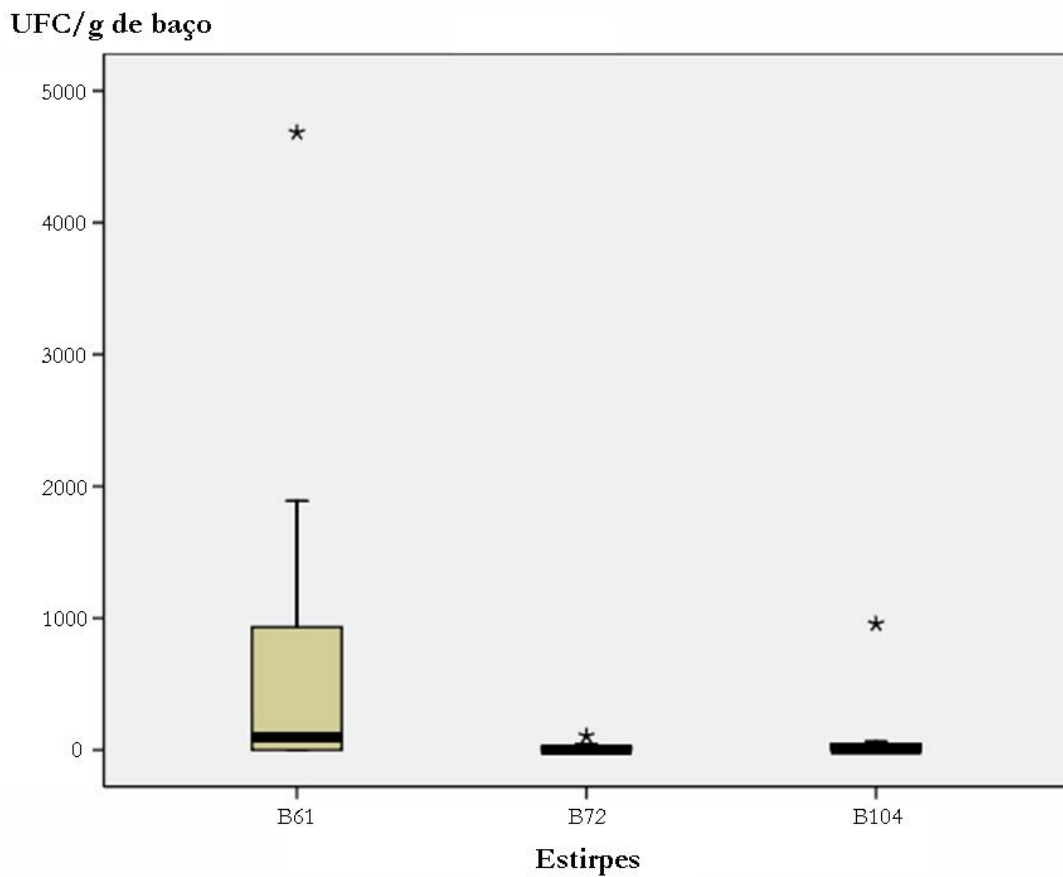


Gráfico 3 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família genética PIG B – São Paulo – 2005

Para a família PIG C, houve diferença entre as contagens de UFC de *M. avium* por grama de baço das estirpes C44, C68 e C122 (KRUSKAL-WALLIS: $p < 0,001$). Os resultados do pós-teste de Dunn constam da tabela 4 e o gráfico 4 ilustra a mediana e os quartis verificados para cada uma dessas estirpes.

Tabela 4 - Valores de p para a comparação do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família genética PIG C – São Paulo – 2005

Estirpes	C44	C68
C68	0,118	-
C122	<0,001	0,001

UFC/g de baço

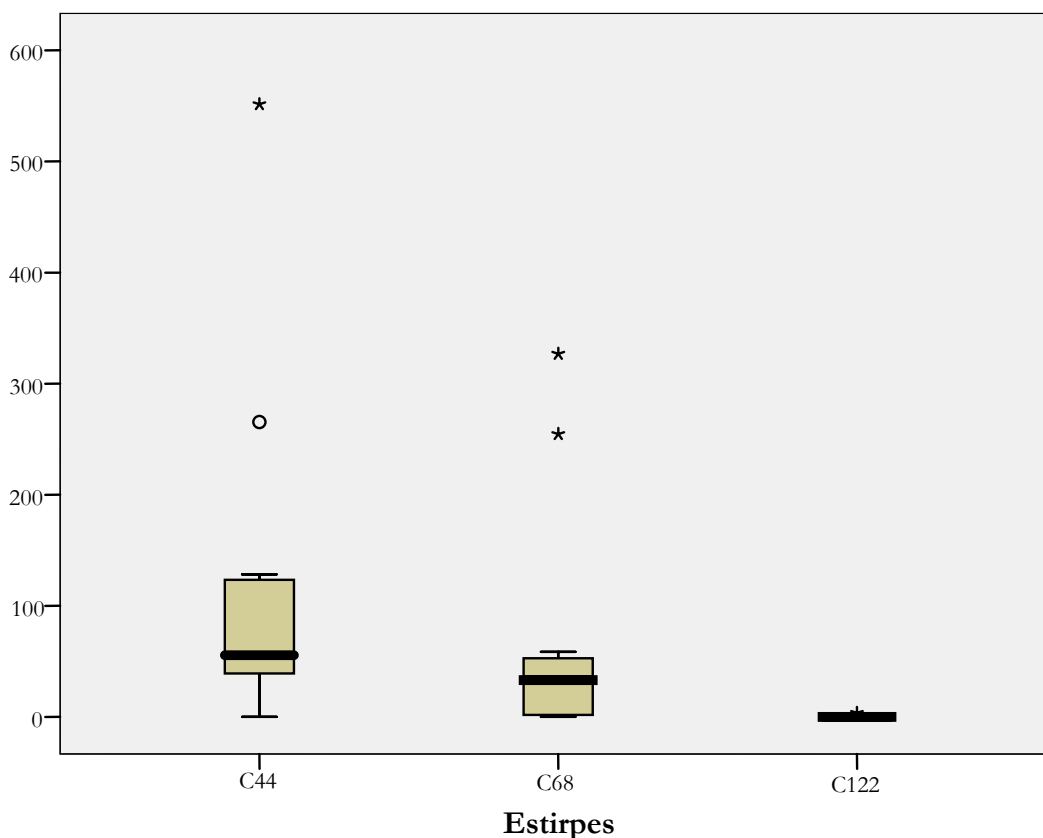


Gráfico 4 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família genética PIG C – São Paulo – 2005

Não houve diferença entre as contagens de UFC de *M. avium* por grama de baço das estirpes D116, D242 e D243 (KRUSKAL-WALLIS: $p=0,87$). O gráfico 5 ilustra a mediana e os 1º e 3º quartis obtidos para cada uma dessas estirpes.

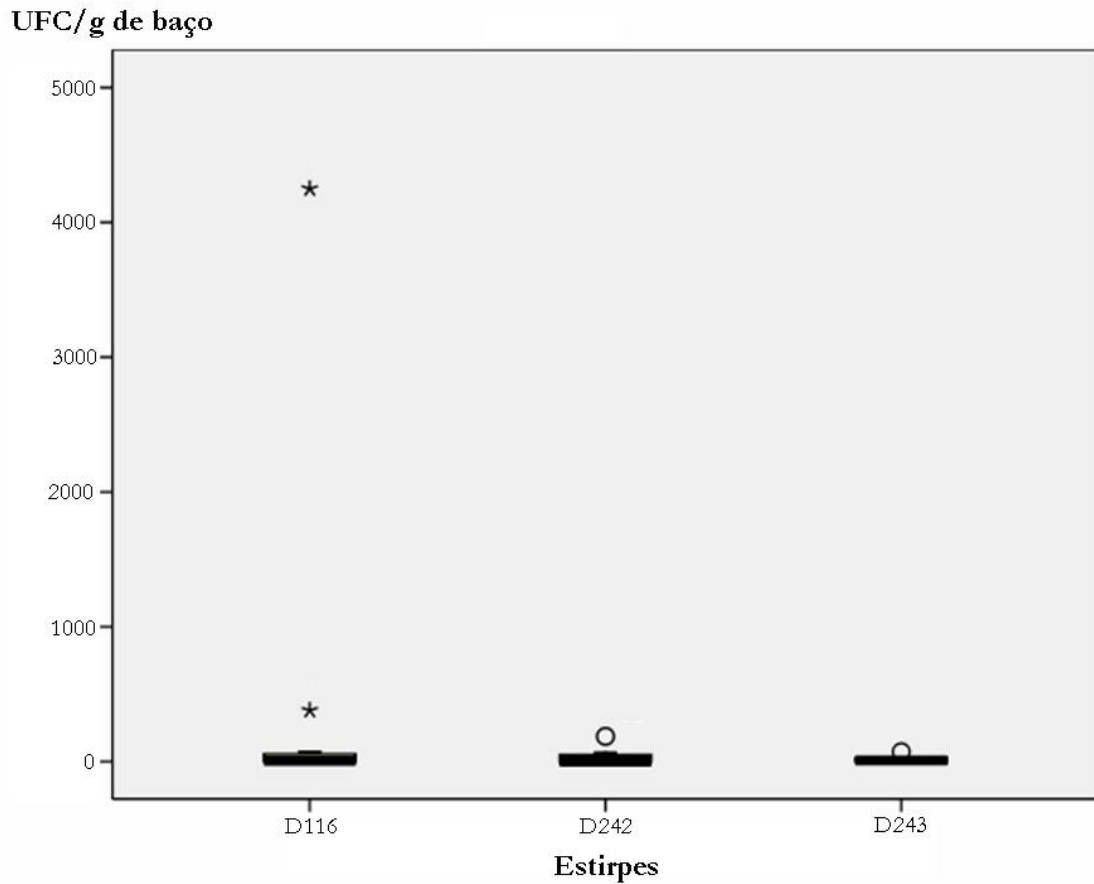


Gráfico 5 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes da família genética PIG D – São Paulo – 2005

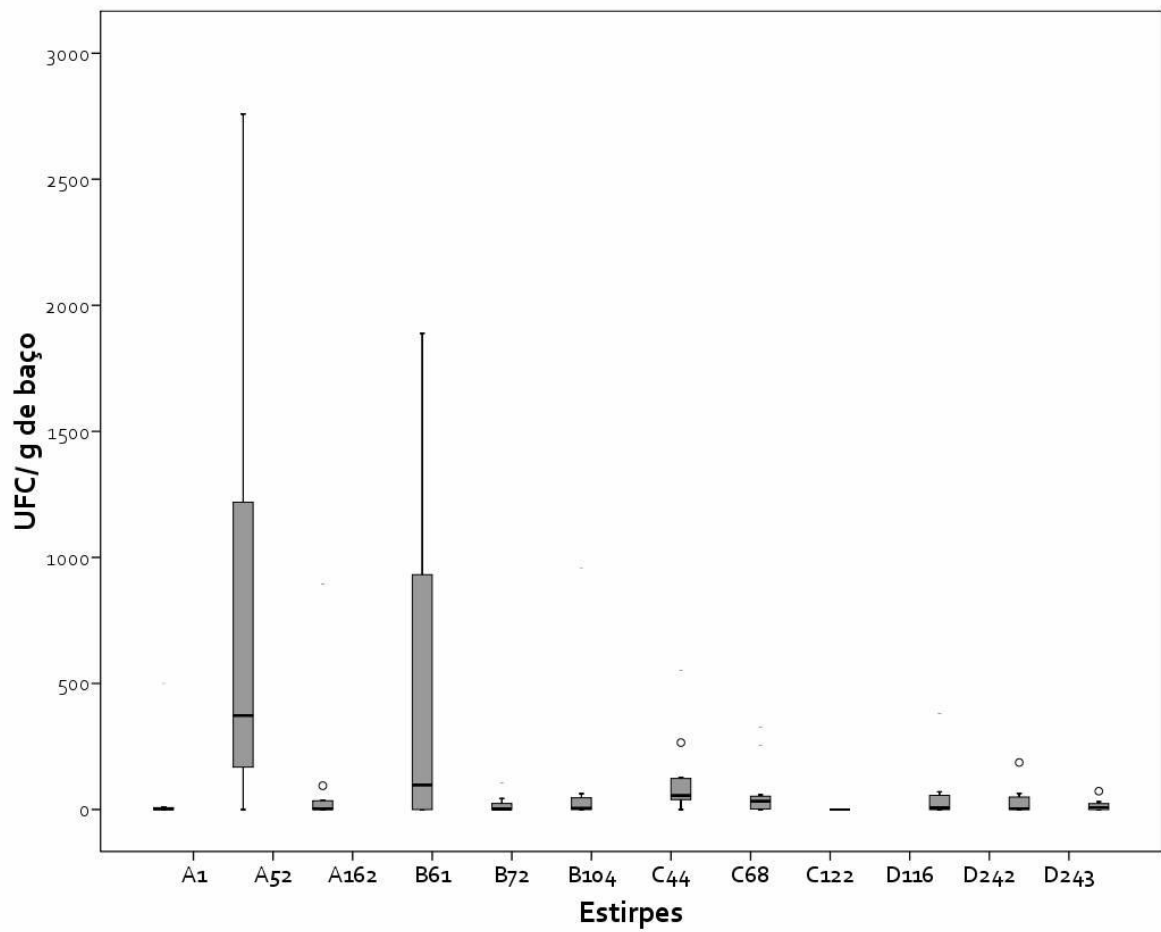


Gráfico 6 - Mediana e 1º e 3º quartis do número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamsters experimentalmente infectados, segundo as várias estirpes – São Paulo – 2005

5 DISCUSSÃO

As estirpes de *Mycobacterium. avium* utilizadas foram agrupadas em quatro famílias distintas segundo padrões semelhantes de bandas obtidas em experimentos de RFLP utilizando a seqüência de inserção IS1245 (SIRCILI, 1999). Embora as sondas utilizadas para a realização do RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) sejam, por natureza, elementos móveis, correndo-se o risco de haver sondas semelhantes em bactérias não relacionadas ao MAC (TURENNE et al., 2008), a probabilidade de isolados que não sejam da espécie *M. avium* terem sido incluídos neste experimento é praticamente nula, tendo em vista as características de crescimento desses isolados em meio de cultura e os perfis de restrição verificados pela técnica de PCR-PRA (*Polymerase Chain Reaction – PCR Restriction Analysis*) por SIRCILI (1999).

A hipótese testada foi se o RFLP é um marcador de virulência para isolados de *Mycobacterium avium*, como haviam sugerido Oliveira et al. (2002). O modelo utilizado foi a inoculação intraperitoneal de hamsters, seguida da quantificação do agente em baço, conforme descrito por Oliveira et al. (2002) e Balian et al. (2003). Optou-se pela quantificação do *M. avium* no baço, pois o agente multiplicou-se mais intensamente nesse órgão do que no fígado ou pulmão (OLIVEIRA et al., 2002).

Os testes realizados com o inóculo mostraram que os animais receberam o agente viável. Não foram isoladas micobactérias dos animais controles eutanasiados, portanto os hamsters utilizados no experimento eram livres desses agentes e as micobactérias isoladas foram resultado exclusivo da infecção experimental.

Durante o experimento, nenhum animal infectado exibiu sinais de doença, mostrando que as estirpes ou isolados de *Mycobacterium avium* aqui estudados eram de baixa virulência. Balian et al. (2003), estudando estirpe de *M. avium* isolada de linfadenite suína, também constatou baixa virulência para hamsters inoculados pela via intraperitoneal.

A tabela 2, que traz os dados crus das contagens de UFC de *M. avium* por grama de baço de hamster, mostra que houve grande variação de contagens entre os isolados ensaiados, porém todos eles foram capazes de produzir infecção e se multiplicarem nos tecidos desses animais. Resultado semelhante foi verificado por Oliveira et al. (2002), que estudaram apenas um representante de cada uma dessas mesmas famílias genéticas diferenciadas pelo método de RFLP.

Quando os resultados das contagens de UFC de *Mycobacterium avium* por grama de baço foram consolidados por família genética e comparados entre si, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,49$) (Tabela 1 e Gráfico 1). Resultado diferente foi observado por Oliveira et al. (2002), que compararam as mesmas famílias genéticas e verificaram que a estirpe representante da família PIG B apresentou uma maior capacidade de se multiplicar nos tecidos de hamsters infectados pela mesma via de inoculação. Essa discrepância de resultados pode ter sido consequência do fato de Oliveira et al. (2002) terem utilizado apenas um isolado representando cada família e no presente experimento foram utilizados três isolados por família.

Nas comparações das contagens de UFC de *Mycobacterium avium* por grama de baço entre os isolados, porém dentro de cada família, não houve diferença estatisticamente significativa entre os isolados das famílias PIG B e PIG D ($p=0,15$ e $p=0,87$, respectivamente). O isolado A52 apresentou a maior capacidade de multiplicação em baço de hamster dentro da família genética PIG A (Tabela 3 e Gráfico 2) e o C122 apresentou a menor dentro da família genética PIG C (Tabela 4 e Gráfico 4). Agentes antigênicos e geneticamente similares podem apresentar diferentes virulências (WEISS et al., 2002).

A comparação das estirpes ou isolados entre si, cujos dados encontram-se nas tabelas 2 e 5 e no gráfico 6, mostrou haver diferença entre eles. As contagens de UFC de *Mycobacterium avium* por grama de baço verificadas para o isolado A52 foram superiores àquelas obtidas para os isolados A1, A162, B72, C122, D242 e D243 (Tabela 5). As contagens de UFC de *Mycobacterium avium* por grama de baço verificadas para os isolados A61 e C44 foram superiores àquelas obtidas para o isolado C122 (Tabela 5). Importante ressaltar que nessa comparação não houve diferença estatisticamente significativa entre os isolados C68 e C122, a qual havia sido constatada quando da comparação entre os isolados dentro da família PIG C (Tabela 4 e Gráfico 4). Isso ocorreu em função da diferença do número de grupos a serem comparados nas duas análises. A comparação dentro da família PIG C foi feita entre três grupos, ou seja, três isolados (C44, C68 e C122). A comparação entre todos os isolados foi feita entre doze grupos, ou seja, todos os isolados ensaiados no presente experimento.

No teste de Kruskal-Wallis, como o erro escolhido ($\alpha=0,05$) é distribuído pelo número de grupos a serem comparados, quanto mais grupos forem comparados mais conservadora será a análise, ou seja, quanto maior o número de grupos a serem comparados, maior deve ser a diferença entre eles para resultar estatisticamente significativa. Importante ressaltar que as diferenças aqui verificadas entre estirpes de diferentes famílias: A52xB72, A52xC122,

A52xD242, A52xD243 e B61xC122, concordam com os resultados obtidos por Oliveira et al. (2002), que relataram contagens maiores para o isolado que representou a família PIG A em relação àqueles que representaram as famílias PIG C e D e também para o isolado que representou a família PIG B em relação ao que representou a PIG C.

Diferentes contagens de UFC de *Mycobacterium avium* por grama de baço de hamster significam diferentes capacidades de produzir infecção, ou seja, diferentes virulências.

Assim, embora tenha havido diferença de virulência entre isolados de diferentes padrões para RFLP, isso não foi verificado quando os isolados foram organizados em famílias genéticas pela similaridade dos padrões de RFLP. Não houve diferença de virulência entre as famílias e houve diferença entre isolados de uma mesma família. Esses resultados sugerem que o RFLP pode ser um marcador de virulência apenas para perfis individuais, porém permanece a dúvida quanto à possibilidade de haver diferença de virulência entre isolados de *M. avium* com iguais perfis de RFLP. Para elucidá-la são necessários estudos ulteriores.

Portanto, isolados de *Mycobacterium avium* com diferentes perfis de RFLP podem apresentar diferentes virulências.

6 CONCLUSÕES

- isolados de *M. avium* com diferentes perfis de RFLP podem apresentar diferentes virulências, independentemente de pertencerem a uma mesma família genética definida com base na similaridade dos padrões de RFLP;
- não há diferença de virulência entre famílias genéticas de *M. avium* estruturadas com base na similaridade dos padrões de RFLP.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: OPAS, 1986. 989 p. Publicación científica n. 503.

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.

APPELBERG, R.; CASTRO, A. G.; GOMES, S.; PEDROSA, J.; SILVA, M. T. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3381-3387, 1995.

ARANAZ, A.; DE JUAN, L.; MONTERO, N.; SÁNCHEZ, C.; GALKA, M.; DELSO, C.; ÁLVARES, J.; ROMERO, B.; BEZOS, J.; VELA, A. I.; BRIONES, V.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2602-2608, 2004.

BALIAN, S. C.; RIBEIRO, P.; VASCONCELLOS, S. A.; PINHEIRO, 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**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 391-397, 1997.

BALIAN, S. C.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; OLIVEIRA, E. M. D.; FERREIRA NETO, J. S. Infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *Mycobacterium avium*. Estudo bacteriológico e histológico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 397-405, 2004.

BOLIN, C. A.; WHIPPLE, D. L.; KHANNA, K. V.; RISDAHL, J. M.; PETERSON, P. K.; MOLITOR, T. W. Infection of swine with *Mycobacterium bovis* as a model of human tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 1559-1566, 1997.

CANGELOSI, G. A.; PALERMO, C. O.; BERMUDEZ, L. E. Phenotypic consequences of red-white colony type variation in *Mycobacterium avium*. **Microbiology**, v. 147, p. 527-533, 2001.

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 4. ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 p.

- CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; LEÃO, S. C. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 745-748, 2004.
- COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMAYER, H. F. A. K.; DE KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, 1998. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/cosivi.htm>>. Acesso em 08 nov. 2008.
- COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 57, p. 641-676, 2003.
- COVERT, T. C.; RODGERS, M. R.; REYES, A. L.; STELMA JR., G. N. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2492-2496, 1999.
- EVERITT, J.; ACLAND, H. M.; WHITLOCK, R. H. Mycobacterial infections in swine. **California Veterinarian**, v. 3, p. 16-18, 1982.
- FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 177-215, 1996.
- FALKINHAM, J. O.; NICHOLS, G.; BARTRAM, J.; DUFOUR, A.; PORTAELS, F. Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potential public health significance. In: PEDLEY, S.; BARTRAM, J.; REES, G.; DUFOUR, A.; COTRUVO, J. A. **Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management**. London: WHO, 2004. p. 15-25.
- 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 hamsters experimentalmente infectados com *Mycobacterium bovis*, estirpe AN 5. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 131-139, 1994.
- FLÓRIDO, M.; APPELBERG, R.; ORME, I. M.; COOPER, A. M. Evidence for a reduced chemokine response in the lungs of beige mice infected with *Mycobacterium avium*. **Immunology**, v. 90, p. 600-606, 1997.
- FURNEY, S. K.; SKINNER, P. S.; ROBERTS, A. D.; APPELBERG, R.; ORME, I. M. Capacity of *Mycobacterium avium* isolates to grow well or poorly in murine macrophages

resides in their ability to induce secretion of tumor necrosis factor. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 10, p. 4410-4413, 1992.

GANGADHARAM, P. R. J. Beige mouse model for *Mycobacterium avium* complex disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n.8, p. 1647-1654, 1995.

GARRIGA, X.; CORTÉS, P.; RODRIGUEZ, P.; MARCH, F.; PRATS, G.; COLL, P. Comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis for typing clinical isolates of *Mycobacterium avium* subsp *avium*. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 5, p. 463-472, 2000.

GUERRERO, C.; BERNASCONI, C.; BURKI, D.; BODMER, T.; TELENTI, A. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 304-307, 1995.

GUTIÉRREZ, M.; SAMPER, S.; GAVIGAN, J. A.; MARÍN, J. F. G.; MARTÍN, C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2953-2956, 1995.

GYLES, C. L.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University Press, 1986. 227 p.

HOLT, J. G.; BERGEY, D. H.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; WILLIAMS, S. T. 9. ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

INDERLIED, C. B.; KEMPER, C. A.; BERMUDEZ, L. E. M. The *Mycobacterium avium* Complex. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 266-310, 1993.

INDERLIED, C. B. Microbiology and minimum inhibitory concentration testing for *Mycobacterium avium* complex prophylaxis. **American Journal of Medicine**, v. 102, p. 2-10, 1997.

KOIVULA, T.; CRISTEA-FERNSTRÖM, M.; CHRYSSANTHOU, E.; PETRINI, B.; KÄLLENIOUS, G. Genetic diversity in clinical isolates of *Mycobacterium avium* complex from Guinea-Bissau, West Africa. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1320-1325, 2004.

LI, Y.; MILTNER, E.; WU, M.; PETROFSKY, M.; BERMUDEZ, L. E. A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 539-546, 2005.

LONG, E. G.; EWING 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.

McFADDEN, J. J.; BUTCHER, P. D.; THOMPSON, J.; CHIODINI, R.; HERMON-TAYLOR, J. The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. **Molecular Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 283-291, 1987.

NICHOLS, G.; FORD, T.; BARTRAM, J.; DUFOUR, A.; PORTAELS, F. Introdução. In: PEDLEY, S.; BARTRAM, J.; REES, G.; DUFOUR, A.; COTRUVUO, J. A. **Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management**. London: WHO, 2004. p. 1-14.

O'GRADY, D.; FLYNN, O.; COSTELLO, E.; QUIGLEY, F.; GOGARTY, A.; McGUIRK, J.; O'ROURKE, J.; GIBBONS, N. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* isolates from animal and human sources. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 3, p. 278-281, 2000.

OLIVEIRA, E. M. D.; MORAIS, Z. M.; TABATA, R.; DIAS, R. A.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; MORÉS, N.; GUERRA, J. L.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; BALIAN, S. C.; FERREIRA NETO, J. S. Avaliação da virulência em hamsters (*Mesocricetus auratus*) de estirpes de *Mycobacterium avium* presentes na população de suínos no sul do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 202-207, 2002.

OLIVEIRA, E. M. D. **Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium* em suínos**. 2005. 85 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

PEDROSA, J.; FLÓRIDO, M.; KUNZE, Z. M.; CASTRO, A. G.; PORTAELS, F.; McFADDEN, J.; SILVA, M. T.; APPELBERG, R. Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolates in mice. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 98, n. 2, p. 210-216, 1994.

PESTEL-CARON, M.; ARBEIT, R. D. Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1859-1863, 1998.

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.

RICHTER, E.; WEIZENEGGER, M.; RÜSCH-GERDES, S.; NIEMANN, S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2672-2675, 2003.

ROIZ, M. P.; PALENQUE, E.; GUERRERO, C.; GARCIA, M. J. Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1389-1391, 1995.

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 *M. intracellulare*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1694-1697, 1990.

SARMENTO, A. M.; APPELBERG, R. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in in vitro-cultured mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 3759-3764, 1995.

SHINNICK, T. M.; GOOD, R. C. Mycobacterial taxonomy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 884-901, 1994.

SILVA, V. S.; MORES, N.; DUTRA, V. D.; FERREIRA NETO, J. S.; SAAD, M. H. F. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 562-566, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000600002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 set. 2008.

SIRCILI, M. P.; ROXO, E.; LEÃO, S. C. Discrimination of members of the *Mycobacterium avium* complex by polymerase chain reaction. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 144-148, 1998.

SIRCILI, M. P. **Caracterização molecular de amostras de *Mycobacterium avium* isoladas de suínos na Região Sul do Brasil**. 1999. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 1999.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. Ithaca: Cornell University Press, 1988. 951 p.

TURENNE, C. Y.; WALLACE JR., R.; BEHR, M. A. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 205-229, 2007.

UEKI, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; TELLES, M. A. S.; VIRGILIO, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2005.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). Food Safety and Inspection Service. Washington, DC. **Tuberculosis**. What you need to know. 1997. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/tbbroch.htm>>. Acesso em: 08 nov. 2008.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. W.; HAAGSMA, J.; EGER, T.; HERMANS, P. W. M.; RITACCO, V.; ALITO, A.; VAN EMBDEN, J. D. A. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2425-2433, 1994.

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. IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 3051-3054, 1998.

WEISS, D. J.; EVANSON, O. A.; MORITZ, A.; DENG, M. Q.; ABRAHAMSEN, M. S. Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5556-5561, 2002.

YANGCO, B. G.; LACKMAN-SMITH, C.; SPINOZA, C. G.; SOLOMON, D. A.; DERESINSKI, S. C. The hamster model of chronic *Mycobacterium avium* complex infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 556-561, 1989.