

MICOBACTÉRIAS ISOLADAS DE TATUS *DASYPUS NOVEMCINCTUS* INOCULADOS COM *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

Arlete Aparecida Martins COELHO 1
Paulo Pinto GONTIJO FILHO 2
Leila de Souza FONSECA 3
Marlei Gomes da SILVA 4
Holmes Campanelli COSTA 5

RESUMO - Os autores relatam o isolamento de duas micobactérias do fígado e do baço de tatús inoculados com o *Micobacterium leprae* no meio de Kato. Os resultados são discutidos.

Palavras chave: Micobactéria. Tatú. Meio ambiente.

1- REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Depois que o tatú de nove bandas, *Dasy-
pus novemcinctus*, começou a ser utilizado
como animal de experimentação em han-
seniase, foram feitos vários relatos sobre o
isolamento **In vitro** de micobactérias pro-
venientes de seus tecidos.

Um bacilo escotocromogênio foi isolado
por Nakamura, M. et. al 7, em 1976, em meio
de Ogawa.

Kirchheimer, W.F.⁶, em 1979, isolou uma
micobactéria do linfonodo de um tatú inocu-
lado com *Mycobacterium leprae*.

Nishiura, M. et. al⁸, em 1980, isolaram do
baço de um animal com hanseníase natural,
Mycobacterium scrofulaceum, *M. intracellulare*.

Prabakharan, K. et al.¹², em 1980, isolaram
e cultivaram um bacilo álcool ácido resistente
de um animal inoculado.

Smith, J.H. et. al.¹², em 1983, isolaram,

(1) Residente em biologia da FUNDAP do Hospital Lauro de Souza Lima.

(2) Professor titular do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

(3) Professora adjunta do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

(4) Técnico de laboratório do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

(5) Professor adjunto da disciplina na Microbiologia na Universidade do Sagrado Coração, Bauru, estado de São Paulo, e Biólogo do Hospital Lauro de Souza Lima.

M. avium intracellulare e *M. gordonae*, de um tatu selvagem não portador de hanseníase natural.

Binford, C.H. et al.², em 1977, isolaram uma micobactéria pertencente ao complexo *M. avium intracellulare* de uma animal portador natural da doença.

A hipótese de que a infecção com o bacilo de Hansen favorece a multiplicação de algumas cepas cultiváveis de micobactérias, parece ser confirmada com os dados obtidos de culturas de tecidos de animais previamente infectados, nos quais foram cultivados um maior número de micobactérias. As espécies mais freqüentemente isoladas pertencem ao complexo MAIS (*M. avium intracellulare scrofulaceum*), *M. gordonae* e *M. terrae*. Estas espécies foram encontradas em tatus selvagens não infectados, em portadores de infecção natural, bem como nos inoculados (Portaels F. et al.¹⁰).

A partir do trabalho de Portaels, F. et al.⁹, 1982, foram estabelecidas, temporariamente, novos grupos para determinadas micobactérias que não se encaixavam na classificação de Jenkins et al., em 1988, sendo estas denominadas ADM (armadillo-derived mycobacteria). Estas cepas foram obtidas à partir de fígados de tatus inoculados experimentalmente com *M. leprae*. O padrão de ácidos micólicos das cepas de ADM difere totalmente do encontrado nas demais micobactérias. Propriedades culturais, bioquímicas, metabólicas e patológicas, padrões obtidos de técnicas de hibridação DNA-DNA, diferem-nas também claramente do *M. leprae*. Amostras obtidas na Flórida, Estados Unidos da América, particularmente do biotipo natural de tatus, produzem vastas cepas de micobactérias, porém nenhuma classificada como ADM. Estas cepas de ADM não foram também, encontradas em tatus não inoculados (Portaels, F. et al.¹⁰).

Assim, parece existir uma correlação entre a viabilidade do *M. leprae* em tecidos de animais inoculados e o crescimento das ADM **In vitro**. Desse modo, uma maior proporção de *M. leprae* viáveis favoreceria a positividade das culturas de ADM (Portaels, F. et al.⁹). A importância da presença desses bacilos álcool ácido resistentes em tecidos de tatus decorre diretamente da influência que poderiam ter em resultados sobre a purificação de *M. leprae* e da relação que teriam com o mesmo (Portaels, F. et al.⁹). O cultivo **in vitro** das ADMs permitiria determinar características específicas que poderiam ser usadas como marcadores que eventualmente as diferenciariam do *M. leprae* (Portaels, F. et al.¹⁰). Contudo o cultivo de ADM torna-se difícil, uma vez que crescem pobremente nos meios de cultura para micobactérias utilizados em rotina. Algumas cepas exigem meios mais complexos que contenham fatores de crescimento denominados micobactinas mais compostos quelantes de ferro (Francis et al., 1949; Kato, L.⁴).

Outras micobactérias, como o *M. paratuberculosis* que são deficientes desses fatores, são incapazes de se reproduzir **In vitro**.

O cultivo freqüente de outras micobactérias, distintas do bacilo de Hansen, a partir de tecidos de pacientes portadores de hanseníase, levantou a hipótese de que provavelmente essas micobactérias agiriam como cofatores no desenvolvimento do *M. leprae*, considerado então um microrganismo micróbio dependente (Kato, L.^{4,5}).

Algumas cepas de ADM parecem ser deficientes para produzir micobactina necessária ao seu desenvolvimento **in vitro**, enquanto que de outras já foi possível realizar o isolamento de algumas micobactinas.

2 - MATERIAL E METODOS

Foram utilizados fígados e baços de 3 tatus

(*Dasyus novemcinctus*) previamente inoculados com suspensões de *M. lepras* provenientes de hansenomas de indivíduos portadores de hanseníase virchoviana do Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, estado de São Paulo.

O material triturado foi tratado com ácido sulfúrico a 4% e hidróxido de sódio a 30% para descontaminação¹. Posteriormente foi inoculado nos meios de Lowenstein - Jensen e de Kato. Dois tubos de cada meio foram inoculados com o mesmo material.

As colônias evidenciadas em cada tubo foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen à

frio.

3 RESULTADOS

Todas as culturas efetuadas no meio de Lowenstein - Jensen não apresentaram crescimento. O maior número de contaminação foi observado também nesse meio, cerca de 83%.

O inóculo do baço do tatú de número 28 e o do fígado do de número 09, apresentaram crescimento no meio de Kato.

TABELA - Isolamento de micobactérias a partir de órgãos de tatús (*Dasyus novemcinctus*) inoculados com *Mycobacterium lepras*.

Nº DO ANIMAL	FÍGADO		BAÇO	
	Melo de Lowenstein Jensen	Melo de Kato	Melo de Lowenstein Jensen	Melo de Kato
09	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
73	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento, revelam crescimento apenas no meio de Kato, o que nos leva a supor que essas micobactérias possam ser do grupo ADM. Apesar do pequeno número de animais testados, nossos resultados não concordam com os obtidos

por DRAPER, em 1983, que verificou que em animais previamente infectados por *M. lepras* a incidência de isolamento do complexo MAIS está aumentada, desde que não obtivemos isolamento no meio de Lowenstein-Jensen.

No entanto a correlação entre a viabilidade do *M. leprae* em tecidos de animais inoculados

e o crescimento de ADM **in vitro** é de difícil questionamento, pois em nosso trabalho não avaliamos a quantidade de *M. leprae* viáveis no inóculo, através de inoculação em coxim plantar de camundongos, nem identificamos a cepa isolada.

○ tratamento utilizado para descontaminação do material utilizando neutralização, forneceu uma percentagem de contaminação (83%), principalmente no meio de Lowenstein-Jensen. Porém a utilização de descontaminantes, sem posterior neutralização, pode levar o inóculo a diminuir muito o pH do meio

- que inibiria o crescimento das ADM, que apresentam um crescimento em variação de pH estreita, de 5,4 a 5,7, segundo Portaels, F. et al.⁹.

○ meio de Kato foi utilizado como substituto ao meio de Ogawa, que vem sendo largamente utilizado no isolamento de ADMs, tendo em vista a pouca diferença de pH que eles apresentam; Ogawa pH 6,0 e Kato pH 5,8. A dificuldade de cultivar ADM em Lowenstein-Jensen pode ser consequência do pH do meio, 7,0, extremamente elevado para as exigências desse grupo.

Tanto o meio de Ogawa, quanto o meio de Kato, são meios mais complexos, enriquecidos em suas composições, com micobactina, que no caso do meio de Kato, utiliza o *M. phlei* morto pelo calor como doador de micobactina e exoquelante.

A utilização de micobactina se torna necessária para o crescimento de determinadas cepas de ADM que não são capazes de produzi-la.

O cultivo **In vitro** de ADM e seu subsequente estudo, inclusive utilizando técnicas de hibridação DNA-DNA, forneceriam maiores informações e condições para determinar as proporções entre *M. leprae* e ADM presentes em tecidos de tatús infectados; evita-se com isso, desvios de resultados na purificação de *M. leprae*, além de que poderia nos trazer mais conhecimentos a respeito desse bacilo ainda não cultivado **in vitro**.

Por outro lado, um estudo mais detalhado sobre a presença ou não de ADM em hanseomas humanos se faz necessário como sugerido por Portaels, F. et al.⁹, para esclarecer, no mínimo, a sua origem. O fato de que essas cepas crescem melhor em pH ácido não exclui a possibilidade que possam viver dentro de um fagossoma de macrófagos³, cujo pH varia de 5,4, a 5,7 e portanto, estar presente em pacientes hanseianos juntamente com o *M. leprae*.

Os resultados apresentados no presente estudo são preliminares, e daremos prosseguimento com isolamentos de micobactérias a partir de animais infectados e hanseomas de pacientes com posterior identificação das cepas isoladas.

ABSTRACT - The authors report the isolation of two mycobacteria from armadillo livers and spleens, inoculated with *Mycobacterium leprae* in the Kato medium. They discuss this results.

Key Words: Mycobacteria. Armadillo. Environment.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BIER, O. - **Bacteriologia e Imunologia**, 22a. ad., São Paulo, Melhoramentos, 1982, 1062p.
- 2 - BIFORD, C.H.; MEYERS, W.M.; WALSH, G.P.; STORRS, E.E. & BROW, H.L. Naturally acquired leprosy - like disease in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*): histopathologic and microbiologic studies of tissues. **J. Reticuloendoth Soc.** 4:367-388, 1977.
- 3 - CHANG, K.P. Endocytosis of Leishmania-infected macrophages. Fluorometry of pinocytic rate, lysosome - phagosome fusion and intralysosomal pH in **The Host Invader Interplay**, ed. H. Van Den Bossche. Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 231-234, 1980.
- 4 - KATO, L. Investigations into the cultivation of *Mycobacterium leprae*. A multifactorial approach. **Leprosy Rev.**, 57(s3): 209-19, 1986.
- 5 - KATO, L. - A multifactorial medium with growth factors from leprosy derived mycobacteria proposed in cultivation trials for *Mycobacterium leprae*. **Int. J. leprosy**, 54(2): 310-11. 1986.
- 6 - KIRSCHHEIMER, W.F. - Examination of North American armadillos for myco bacteriosis. A further report. **Leprosy India**, 51: 60-60. 1979.
- 7 - NAKAMURA, M.; TOH, T.; WAKI, C. - Isolation of a cultivable mycobacterium from an armadillo sub cutaneous tissue infected with *M. leprae* and characterization of this isolated strain. **La lepro**, 45⁴217-22, 1976.
- 8 - NISHIURA, M.; FUKUNISHI, Y.; OKADA, S.; ABE, M.; KOHSAKA, K.; YONEDA, K.; MORI, T.; ITO, T.; BRETANA, A.; CONVIT, J.; WALSH, G.P.; MEYERS, W.M.; BINFORD, C.H. - A Joint study on the naturally acquired leprosy like disease of armadillos. **Int. J. Leprosy** 48: 493-494, 1980.
- 9 - PORTAELS, F.; FRANCKEN, A. & PATTYN, S.R. Bacteriological studies of armadillos livers infected with *Mycobacterium leprae*. **Ann. Soc. Beige Med. Trop.** 62: 233-45, 1982.
- 10 - PORTAELS, F.; ASSELINEAU, C.; BAESS, I.; DAFFÉ, M.; DOBSON, G.; DRAPER, P.; GREGORY, D.; HALL, R.M.; IMAEDA, T.; JENKINS, P.A.; LANEELLE, M.A.; LARSSON, L.; MAGNUSSON, M.; MINNIKIN, D.E.; PATTYN, S.R.; WIETEN, G. & WHEELER, P.R. A cooperative taxonomic study of mycobacteria isolated from armadillos infected with *Mycobacterium leprae*. **J. Gen. Microbiol**, 132: 2.698-07. 1986.
- 11 - PRABHAKARAN, K.; HARRIS, E.B.; KIRSCHHEIMER, W.F. Failure to detect o-diphenoloxidase in cultivable mycobacteria obtained from feral armadillos. **Lepr. Rev.** 51: 341-349, 1980.
- 12 - SMITH, J.H.; FOLSE, D.S.; LONG, E.G.; CHRISTIE, J.D.; CROUSE, D.T. TEWES, M.E.; GATSON, A.M.; EHRHARDT, R.L.; FILE, S.K.; & KELLY, M.T. Leprosy like disease of wild armadillos in French acadiana, Louisiana. **M.T.J. Reticuloendoth. Soc.** 34: 75-88, 1983.

Recebida para publicação em outubro de 1988; aceito para publicação em dezembro de 1988.