



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

LINFADENITE GRANULOMATOSA SUÍNA

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Inovação Alimentar

por
Maria Helena Soares Braga

Julho 2012



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

LINFADENITE GRANULOMATOSA SUÍNA

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Inovação Alimentar

por

Maria Helena Soares Braga

Local: CBQF, Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Professora Doutora Paula Teixeira e Doutora Joana Silva

Julho 2012

Resumo

Os resultados da inspecção sanitária (IS) de carne nos matadouros indicam que podem existir riscos devido a carne não segura obtida de carcaças de suínos durante o abate. Estes riscos são eliminados através de uma rigorosa inspecção veterinária dos animais antes do abate, assim como da carne e órgãos após o mesmo. A informação obtida durante a IS em matadouros é importante para o desenvolvimento de um sistema de melhoria da qualidade da carne de porco. As observações efectuadas ao longo do período de estágio final da licenciatura em Medicina Veterinária em que foram acompanhadas as tarefas de IS desempenhadas pelo médico veterinário oficial (MVO) permitiram concluir que, não obstante os recentes regulamentos comunitários e as políticas de segurança alimentar instituídas, existem ainda lacunas que podem impedir o pleno cumprimento do seu papel. Ainda ficou constatado que na legislação em vigor não existem parâmetros bem definidos para o MVO saber qual a decisão sanitária (DS) a tomar caso se depare com uma situação de linfadenite granulomatosa em suínos, o que contribui para o incremento da dificuldade em estabelecer esta mesma decisão, não por falta de conhecimentos acerca da fisiopatologia da doença, mas pela ausência de um documento legal que a descreva textualmente e garanta a segurança e o enquadramento das DS tomadas pelo MVO.

A tuberculose (TB) continua a provocar perdas económicas significativas em suiniculturas em todo o mundo; os suínos são susceptíveis à infecção com complexo *Mycobacterium avium* (MAC), complexo *M. tuberculosis*, *M. bovis* e micobactérias condicionalmente patogénicas (CPM). O complexo *Mycobacterium avium* inclui um grupo heterogéneo de bacilos ubiqüitários de crescimento lento divididos em duas espécies (*M. avium* e *M. intracellulare*) que podem causar diversas doenças em animais e humanos. A elevada incidência de lesões granulomatosas associadas à presença de *Rhodococcus equi* pode ser considerada como uma causa de diagnóstico errado de infecções por *M. avium* subsp. *avium* em casos em que a IS é executada apenas com base na observação de alterações granulomatosas nos gânglios linfáticos (GL), pois esta bactéria é também associada a linfadenite granulomatosa, afectando GL da cabeça e pescoço de suínos; no matadouro, as lesões são facilmente confundidas com TB, sendo este organismo mais importante por esta razão do que pela causa de doença clínica manifestando sintomatologia. De acordo com a legislação da inspecção sanitária de carnes em matadouro, as carcaças de animais com TB generalizada devem ser consideradas impróprias para consumo humano; em caso de lesões granulomatosas localizadas, apenas as partes do corpo ou órgãos afectados e GL adjacentes são reprovados. Perante lesões compatíveis com linfadenite granulomatosa por *R. equi*, a DS a aplicar consiste apenas na remoção dos GL afectados. A autoridade veterinária nacional considera de forma errónea que as lesões de linfadenite granulomatosa suína se devem exclusivamente a bactérias do género *Mycobacterium*, sendo o Inspector Sanitário deste modo obrigado a agir de acordo com o estabelecido.

Assim, o objectivo primordial deste estudo efectuado no âmbito do mestrado em Inovação Alimentar foi a tentativa de demonstração da possível presença de *R. equi* em GL submandibulares afectados por lesões granulomatosas, recolhidos aquando da IS em matadouros (Central e Linda Rosa), em detrimento de *Mycobacterium* spp.

Tendo em conta os resultados obtidos, este estudo demonstrou que existe a probabilidade das lesões granulomatosas encontradas em GL submandibulares de suínos poderem não ser devidas a *Mycobacterium* spp., mas sim a *R. equi*.

Abstract

The results of meat inspection in slaughterhouses indicate that there might be risks due to unsafe meat from swine carcasses, but these hazards can be eliminated through a thorough veterinary inspection of the animals prior to the slaughter, as well as the examination of the meat and organs after. The information obtained during the meat inspection in slaughter houses is important to the development of a pork quality improvement system. My observations during the final internship of my graduation as a veterinary, in which I was able to accompany the meat inspector tasks, allowed me to conclude that there are a lot of gaps when it comes to community regulations and food safety policies. It was also noticed that there are no well established parameters when it comes to this pathology (swine granulomatosis lymphadenopathy) in the recent legislation and this further contributes to the rising difficulty in making a decision whether to approve or disapprove the meat, not for lack of knowledge about the physiopathology of the disease, but for the absence of a legal document describing the sanitary decision, guaranteeing the meat safety.

Tuberculosis (TB) continues to cause significant economic losses for swine explorations around the world; pigs are susceptible to the infection with *Mycobacterium avium* complex (MAC), *M. tuberculosis* complex, *M. bovis* and conditionally pathogenic mycobacteriae. MAC includes an heterogeneous group of slow growing ubiquitous bacilli divided into two species (*M. avium* and *M. intracellulare*) that may origin disease in animals and human. The great incidence of granulomatous lesions associated with *Rhodococcus equi* could be considered a reason for misdiagnosis of *M. avium* subsp. *avium* in places where the meat inspection is based solely in the observation of granulomatous alterations of the lymph nodes, as this bacterium is also linked to swine granulomatosis lymphadenopathy in the head and neck. In slaughterhouses these type of lesions are easily confused with TB which makes *R. equi* an important microorganism for this particular motive, as it does not course with major clinical disease. According to the meat inspection legislation, the carcasses of animals with generalized TB should be rejected, but in case of localized granulomatosis lesions, only the affected body parts or organs as well as the adjacent lymph nodes should be considered improper. When it comes to granulomatosis lymphadenopathy caused by *R. equi*, the sanitary decision consists only in the removal of the affected lymph nodes. The national veterinary authority erroneously considers that the swine granulomatosis lymphadenopathy lesions are exclusively due to bacteria of the *Mycobacterium* gender, and the sanitary inspector is obligated to act on these terms.

The main objective of this study was the attempt of demonstration of the possible presence of *R. equi* in submandibular lymph nodes affected by granulomatous lesions; these were collected during meat inspection in slaughterhouses (Central and Linda Rosa).

Considering the study results, it was assumed that there is the probability that this type of lesions found in swine submandibular lymph nodes may be due to *R. equi* instead of *Mycobacterium* spp.

Agradecimentos

Antes de mais gostaria de agradecer à Dra. Virgínia Capêlo por se ter disponibilizado prontamente para me ajudar na recolha de material nos matadouros e pela disponibilidade e generoso apoio.

Agradeço do fundo do coração aos meus colegas e amigos do laboratório por tudo o que me ensinaram e pela afeição com que me receberam no seu local de trabalho – Lucinha, Ricardo, Ângela e Ana. Sem eles tenho a certeza absoluta que não tinha feito nada disto... Pelas experiências partilhadas e pela amizade que prevaleceu.

Um grande obrigada também ao pessoal do CINATE, sobretudo à Isabel pela simpatia e por me ajudar sempre que precisei e tirar todas as dúvidas que foram surgindo; foi uma enorme ajuda.

Obrigada, claro, à Professora Paula Teixeira por me ter disponibilizado o seu laboratório, pelo entusiasmo demonstrado por este trabalho e sobretudo pelo encorajamento.

À Professora Joana Laranjeira pelo carinho e por não me ter deixado desesperar quando era o que mais me apetecia!

À Professora Getty do ICBAS que me ajudou de início, e talvez nem saiba o quanto!

À Professora Eduarda Gomes Neves do ICBAS pelo apoio estável e auxílio constante em todas as fases da minha vida académica!

Obrigada também aos meus pais pela compreensão e por me terem sempre apoiado e proporcionado esta oportunidade. À minha mãe por ser minha mãe e ao meu pai por me ter ajudado muito com a formatação da tese; sem ele não sei o que faria!

Ao Tommy também... pela companhia durante a escrita desta tese!

Ao Tiago, obrigada por estar sempre lá! Pelo apoio incondicional, pela paciência, companheirismo e felicidade transmitidos ao longo de todo este percurso. E por não me deixar desanimar quando era o que mais me apetecia.

A todos, o meu sincero e profundo Obrigada!

Índice

Resumo	2
Abstract.....	4
Agradecimentos	5
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	9
Lista de abreviaturas	10
1. Introdução	
1.1. Enquadramento.....	11
1.2. Importância das micobactérias ambientais	11
1.3. Papel da Inspeção Sanitária no controlo de zoonoses	13
1.4. Linfadenite granulomatosa suína	15
1.5. Características de <i>Mycobacterium</i> spp. e de <i>Rhodococcus equi</i>	27
1.6. Objectivos do estudo	29
2. Materiais e Métodos	
2.1. Recolha das amostras	30
2.2. Preparação de meio de crescimento e de reagentes	30
2.3. Preparação das amostras	31
2.4. Testes de confirmação das amostras susceptíveis de <i>R. equi</i>	36
2.5. Execução dos testes bioquímicos	
2.5.1. Catalase, oxidase, mobilidade a fresco e coloração de Gram	38
2.5.2. Teste do indole	38
2.5.3. Teste da urease	39
2.5.4. Teste de redução do nitrato	40
2.5.5. Teste da hidrólise da esculina	40
2.5.6. Teste de fermentação dos carboidratos	41
2.5.7. Teste do CAMP	42
3. Resultados	43
4. Discussão	47
5. Conclusões gerais	49
6. Trabalho futuro	51
7. Bibliografia.....	52

Lista de figuras

Figura 1.1 – Amostra 1: GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 17 de Maio de 2011 no matadouro Central.

Figura 1.2 – Amostra 2: GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com RP da cabeça, a 17 de Maio de 2011 no matadouro Central.

Figura 1.3 – Amostra 3: GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com RP da cabeça, a 17 de Maio de 2011 no matadouro Central.

Figura 1.4 – Amostra 4: GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com RP da cabeça, a 17 de Maio de 2011 no matadouro Central.

Figura 1.5 – Amostra 5: GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com RP da cabeça, a 24 de Maio de 2011 no matadouro Central.

Figura 1.6 – Amostra 6: GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com RP da cabeça, a 24 de Maio de 2011 no matadouro Central.

Figura 1.7 – Amostra 7: GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com RP da cabeça, a 24 de Maio de 2011 no matadouro Central.

Figura 1.8 – Amostra 8: GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com RP da cabeça, a 24 de Maio de 2011 no matadouro Central.

Figura 1.9 – Amostra 9: GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com RP da cabeça, a 22 de Junho de 2011 no matadouro Linda Rosa.

Figura 1.10 – Amostra 10: GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com RP da cabeça, a 22 de Junho de 2011 no matadouro Linda Rosa.

Figura 1.11 – Amostra 11: GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com RP da cabeça, a 22 de Junho de 2011 no matadouro Linda Rosa.

Figura 1.12 – Amostra 12: GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com RP da cabeça, a 22 de Junho de 2011 no matadouro Linda Rosa.

Figuras 2.1 a 2.3 – Exemplos das amostras após diluição em lactato de Ringer e posterior utilização do Stomaker para trituração.

Figuras 3.1 a 3.6 – Exemplos das placas obtidas por espalhamento.

Figuras 4.1 a 4.6 – Exemplos das placas obtidas após repicar.

Figura 5 – Teste da catalase.

Figura 6 – Teste da oxidase.

Figura 7.1 – Teste da produção de indole (controlo positivo com *Escherichia coli*).

Figura 7.2 – Teste da produção de indole (resultado negativo).

Figura 8.1 – Teste da urease (controlo positivo com *Proteus mirabilis*).

Figura 8.2 – Teste da urease (resultado positivo).

Figura 8.3 – Teste da urease (resultado negativo).

Figura 9.1 – Teste da redução do nitrato (controlo positivo com *Proteus mirabilis*).

Figura 9.2 – Teste da redução do nitrato (resultado positivo).

Figura 9.3 – Teste da redução do nitrato após adição de zinco em pó (resultado negativo).

Figura 10.1 – Teste da hidrólise da esculina (controlo positivo com *Enterococcus faecalis*).

Figura 10.2 – Teste da hidrólise da esculina (resultado negativo).

Figura 11.1 – Exemplo de controlo positivo do teste de fermentação de açúcares (sacarose), com *Lactobacillus acidophilus*.

Figura 11.2 – Resultado negativo no teste de fermentação da glicose.

Figura 11.3 – Resultado negativo no teste de fermentação da maltose.

Figura 11.4 – Resultado negativo no teste de fermentação da sacarose.

Figura 12 – Teste de CAMP.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Lista dos testes bioquímicos realizados no estudo e resposta de *R. equi*.

Tabela 2 - Composição do meio NANAT selectivo para *R. equi*.

Tabela 3 - Características bioquímicas dos isolados identificados presuntivamente como *R. equi*.

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
CPM – Micobactéria(s) Condicionalmente Patogénica(s)
DDO – Doença de Declaração Obrigatória
DS – Decisão(ões) Sanitária(s)
ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESB – Escola Superior de Biotecnologia
EUA – Estados Unidos da América
g - Grama
GL – Gânglio(s) Linfático(s)
ID – Intradérmico(a)
IHQ - Imunohistoquímica
IS – Inspeção sanitária
kDa - kilodalton
MAA – *Mycobacterium avium* subespécie *avium*
MAC – Complexo *Mycobacterium avium*
MAH - *Mycobacterium avium* subespécie *hominissuis*
mg - Miligrama
mL - Mililitro
MVO – Médico(s) Veterinário(s) Oficial(is)
NANAT – Meio Nutrient Agar + extracto de levedura, com ácido nalidíxico, telurite de potássio e novobiocina
NAYE – Nutrient Agar + Yeast Extract (suplementação com extracto de levedura)
PG – Pós-graduação
Reg. – Regulamento
RP – Rejeição(ões) Parcial(is)
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Subsp. - Subespécie
TB – Tuberculose
TGI – Tracto Gastrointestinal
UCP – Universidade Católica Portuguesa
UE – União Europeia
USDA – United States Department of Agriculture
VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana
ZN – Coloração Ziehl-Neelsen
µg – Micrograma
µm – Micrómetro

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Esta tese foi efectuada no âmbito do mestrado em Inovação Alimentar da Escola Superior de Biotecnologia (ESB) da Universidade Católica Portuguesa (UCP). A escolha do tema baseou-se no estágio efectuado no último ano da licenciatura em Medicina Veterinária no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Esse estágio decorreu sob a orientação da Dr.^a Virgínia Capêlo e tutela da Dr.^a Eduarda Gomes Neves, de acordo com o sistema de rotatividade de MVO por estabelecimentos de abate em vigor na Direcção de Serviços Veterinários da Região Norte, e decorreu no período de 8 de Abril a 15 de Agosto de 2008. Desta forma, existiu a oportunidade de conhecer diversos matadouros nas áreas de Vila Nova de Famalicão (Seara – Indústria de Carnes, Central Carnes, Carnes Gamil e Izicar) e Barcelos (Matadouro Linda Rosa e Carnes Landeiro).

O objectivo desta fracção do estágio curricular em 2008 foi a complementação da teoria leccionada no 5º ano nas disciplinas de IS, com o acesso prático ao universo profissional dos Inspectores Sanitários, e baseou-se no acompanhamento do MVO na actividade de IS *ante-* e *post-mortem* dos animais das espécies bovina, ovina, caprina, suína e equina, assim como de outras funções da sua responsabilidade. Para o relatório a elaborar na altura para conclusão do curso superior, devido à situação actual de rotatividade em vigor na Direcção de Serviços Veterinários da Região Norte, considerou-se ser mais apropriado um modelo de diversos “casos”, com descrição de algumas das patologias mais comumente observadas em matadouro e com as quais também eu me deparei. Na escolha das patologias, foram sobretudo tidas em conta a sua frequência e as fotografias disponíveis, assim como a qualidade das mesmas.

Assim, aquando da realização do relatório de estágio, ficou claro que a linfadenite granulomatosa suína seria um tema bastante interessante e relevante, se existisse posteriormente a oportunidade de lhe dar continuidade. Uma vez que surgiu a possibilidade de inscrição e frequência da Pós-graduação em Segurança Alimentar e posteriormente do mestrado em Inovação Alimentar, com trabalho laboratorial, pensou-se ser um assunto de abordagem útil e valiosa.

1.2. Importância das micobactérias ambientais

As micobactérias ambientais são um cativante e interessante grupo de organismos patogénios que afectam humanos e outros mamíferos e aves, desempenhando um papel significativo na morbidade e mortalidade humanas e um relevante impacto económico na agricultura. As micobactérias fazem parte do género *Mycobacterium*, único género pertencente à família *Mycobacteriaceae*, por sua vez englobada na subordem *Corynebacteriaceae* e ordem *Actinomycetales* (Oliveira, 2005; Suehiro, 2008). Actualmente existem 91 espécies identificadas do

género *Mycobacterium* que não pertencem ao complexo *M. tuberculosis*. Primm *et al.* (2004) defendem que provavelmente existem diversas espécies ainda por descobrir. As micobactérias ambientais são habitantes normais de uma vasta diversidade de reservatórios, incluindo águas naturais e municipais, solo, aerossóis, protozoários, animais e humanos; também a associação externa a plantas ou até a sua invasão é ainda possivelmente uma fonte potencial destas bactérias (Suehiro, 2008). Estudos publicados, conforme exposto por Primm *et al.* (2004), demonstram que os alimentos são também uma fonte de exposição humana a micobactérias ambientais, uma vez que alguns isolados mostraram homologia genética com isolados clínicos. Uma pluralidade de características fisiológicas de *M. avium* e *M. intracellulare* contribuem para a sua elevada concentração nestes ambientes. Grandes quantidades de *M. avium* e *M. intracellulare* foram recuperadas de águas e solos com níveis de oxigénio baixos e podem crescer em condições microaerófilas (Primm *et al.*, 2004; Möbius *et al.*, 2006). Assim, ficou patente que as micobactérias são capazes de sobreviver neste tipo de ambientes e, além disto, as adaptações a condições de acidez e microaerófilas ajudam na virulência de agentes patogénicos intracelulares (Primm *et al.*, 2004).

Existem várias situações em que as distribuições geográficas e ambientais de micobactérias e pessoas podem sobrepor-se e conduzir à conseqüente exposição humana, assim como ao impacto na ecologia micobacteriana. Segundo Primm *et al.* (2004), uma destas grandes sobreposições envolve a água, através da bebida, natação ou banho. Alimentos e cigarros podem ainda ser fontes de infecções por micobactérias. Ademais, a impermeabilidade da sua parede celular não é necessariamente uma desvantagem, uma vez que fornece às micobactérias uma resistência inata a um abundante leque de agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos e desinfetantes; além disto, representa um papel fulcral na sobrevivência intracelular em casos de infecções em animais ou protozoários, uma fase relevante do ciclo de vida micobacteriano. A complexa parede celular lipídica, responsável pela propriedade álcool-ácido resistente, resulta ainda numa superfície celular hidrofóbica que é um factor determinante na distribuição ambiental (Primm *et al.*, 2004). Dois produtos apresentam actividade micobactericida satisfatória, sendo eles hipoclorito de sódio e um produto clorofenólico. A acção bactericida do primeiro sobre *M. fortuitum* apresentou resultados aceitáveis, porém foi já demonstrado que surge uma enorme variabilidade quanto à resistência a desinfetantes entre espécies distintas de micobactérias e até entre estirpes diferentes dentro da mesma espécie (Morés e Silva, 2001).

As interacções das micobactérias ambientais com protozoários são muito importantes por uma grande variedade de razões. Muitos protozoários são predadores bacterianos e a capacidade de sobreviver à fagocitose pelos mesmos é uma vantagem considerável para os bacilos dos meios aquáticos (Primm *et al.*, 2004). *Mycobacterium avium*, *M. fortuitum* e *M. marinum* conseguem invadir e replicar-se dentro de *Acanthamoeba castellanii*, enquanto a bactéria *M. smegmatis*, natural do solo, não foi bem-sucedida (Nishiuchi *et al.*, 2007). *Mycobacterium avium* inibe a fusão lisossomal e possivelmente acaba por matar as amibas infectadas; *M. avium* consegue ainda invadir e replicar-se dentro de *Dictyostelium discoideum*. Comparados com os bacilos que crescem apenas em meio de cultura, *M. avium* cultivado dentro de amibas é mais invasivo no que toca a amibas ou epitélio

humano e macrófagos; assim, os protozoários poderão ser usados como vectores durante a transmissão oral das micobactérias ambientais (Primm *et al.*, 2004). A infecção com *M. avium* cultivado em *A. castellanii*, libertado deste hospedeiro anteriormente à infecção oral em ratinhos, foi associada a um aumento significativo da invasão da mucosa gastrointestinal e do número de unidades formadoras de colónias por grama de tecido no fígado e no baço, em comparação com a carga bacteriana em ratinhos infectados com *M. avium* produzido em agar (Nishiuchi *et al.*, 2007). Estes bacilos intracelulares exibem também uma resistência acrescida a antibacterianos, ou seja, *M. avium* proveniente de *Tetrahymena pyriformis* é mais virulento em galinhas do que o cultivado em meios de laboratório. Isto significa que as micobactérias ambientais possuem relações simbióticas e parasíticas com protozoários; *M. avium* intracelular pode sobreviver durante o seu enquistamento e ser libertado aquando do excistamento, potenciando assim a utilização dos quistos protozoários como veículos para sobreviver à falta de nutrientes e ao stress tóxico.

Os roedores e insectívoros podem ser um reservatório de patogéneos que podem causar doença no Homem, como por exemplo toxoplasmose, praga e leptospirose (Oliveira, 2005; Durnez *et al.*, 2008). É sabido que animais domésticos e selvagens podem ser portadores de micobactérias, já tendo sido encontradas várias espécies patogénicas. A micobacteriose pode assim ocorrer como zoonose no Homem. Os roedores e insectívoros podem ser uma fonte de micobactérias, mas ainda não se sabe se é possível a transmissão ao Homem nem como esta ocorre (Pavlik *et al.*, 2005; Durnez *et al.*, 2008). Num estudo de 2008, apesar de não terem sido isolados membros do complexo *M. tuberculosis* nestes animais, foram isoladas algumas micobactérias potencialmente patogénicas que, apesar de não muito invasivas, podem infectar pacientes com estado de imunidade afectado pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), cancro ou toxoplasmose (Durnez *et al.*, 2008). Também Oliveira (2005) propõe as mesmas conclusões. No referido estudo de Durnez *et al.* (2008), foram isolados dois membros de MAC: *M. intracellulare* de pulmões de ratinho e *M. chimera* de GL mesentéricos de rato, e ainda *M. arupense* e *M. parascrofulaceum*, de importância clínica menor, mas que já causaram doença em vários casos humanos.

1.3. Papel da Inspeção Sanitária no controlo de zoonoses

Segundo Fosse *et al.* (2008), em países industrializados, até 10% da população pode sofrer anualmente de zoonoses alimentares, isto é, doenças e/ou infecções naturalmente e indirectamente transmitidas entre os animais e o Homem através da alimentação. Assim, o controlo dos perigos biológicos transmitidos ao Homem através do consumo de alimentos é de elevado significado em termos de saúde pública. Em 2002, a Comissão Europeia publicou o Regulamento 178/2002, cujo objectivo primordial foi a aplicação da análise de risco à segurança alimentar, optando pela avaliação de risco como primeiro passo. A avaliação de risco é definida como um processo com base científica que consiste em 4 etapas: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (Reg. 178/2002, artigo 3-11). Esta evolução na legislação relativa a segurança alimentar necessita de uma colecção de dados científicos que considerem a natureza, frequência e

impacto na saúde pública na Europa dos perigos biológicos definidos como agentes biológicos ou condição dos géneros alimentícios ou alimentos para animais com o potencial de causar um efeito adverso na saúde (Reg. 178/2002, artigo 3-14). Assim, a severidade de uma zoonose transmitida pela alimentação deve ser combinada com a sua ocorrência no Homem para se poder definir o risco correctamente. O risco é função da probabilidade dum efeito adverso para a saúde e da gravidade desse efeito, conseqüente a um perigo (Reg. 178/2002, artigo 3-9).

Um estudo de 2007 executado por Fosse *et al.* (2008) teve como objectivo ordenar os perigos biológicos transmitidos ao Homem pelo consumo de carne de suíno, uma vez que é a mais frequentemente consumida na União Europeia (UE). Os perigos biológicos foram classificados em duas categorias: 1 – perigos estabelecidos, i.e., perigos perfeitamente identificados em suínos e responsáveis por doença clínica no Homem, cuja transmissão pelo seu consumo foi provada através de estudos caso-controlo; 2 – perigos suspeitos, i.e., perigos documentados em publicações científicas como sendo transmissíveis ao Homem através da via alimentar, mas que não foram claramente identificados em suínos devido à falta de ferramentas para a sua detecção ou ainda perigos que foram descritos em carne de porco, mas cuja patogenicidade como agente zoonótico transmitido pela alimentação não foi ainda confirmada.

Neste estudo, como descrito por Fosse *et al.* (2008), foram encontrados 35 perigos biológicos possivelmente transmitidos ao Homem pelo consumo de carne de porco. Quanto a *Mycobacterium* spp., foi encontrada uma prevalência em carcaças de suínos de cerca de 5.8%, um valor razoável, com um mínimo de 0.67% e um máximo de 10.87%. Num estudo realizado na República Checa por Pavlik *et al.* (2003), entre os anos de 1990 e 1999 foram encontradas lesões tuberculosas pelos inspectores sanitários em 0.32% dos porcos abatidos. Noutro estudo levado a cabo também por Pavlik *et al.* (2005), foram detectadas lesões tuberculosas em apenas 0.22% dos 22 312 580 animais abatidos entre os anos de 2000 e 2004; aliás, o número de porcos com estas lesões não excedeu 0.37% em nenhum dos anos monitorizados, o que pode ser visto como altamente favorável relativamente à década anterior, já que foi testemunhada uma tendência de redução de prevalência de 0.37% em 2000 para 0.1% em 2004, denotando uma prevenção eficaz contra a contaminação dos animais. Quanto à escala de gravidade dos perigos estabelecidos na Europa, *Mycobacterium* spp. obteve uma taxa média de hospitalização de 50.0% e 1.0% de letalidade, encontrando-se em 3º lugar de severidade dos 12 perigos listados, apenas ultrapassado por *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* (Fosse *et al.*, 2008). Na avaliação da exposição, a taxa de incidência de casos clínicos de micobacteriose no Homem devido ao consumo de porco é diminuta (menos de um caso por 100.000 habitantes). Assim, não é surpreendente que, na avaliação de risco, *Mycobacterium* spp. apresente um risco baixo, devido à sua reduzida incidência no Homem. Neste estudo *Mycobacterium* spp. foi então considerado como possuindo uma severidade elevada, porém uma taxa de não-controlo baixa; a avaliação qualitativa de risco indicou que este perigo é caracterizado por taxas de hospitalização e de mortalidade mais baixas do que para *C. botulinum* e *L. monocytogenes*, mas mais altas do que para os outros perigos. Porém, segundo Silva *et al.* (2000), Oliveira (2005), Möbius *et al.* (2006) e Resende *et al.* (2008), as infecções por MAC são reconhecidamente uma das infecções bacterianas oportunistas mais comuns, causando doença sistémica disseminada em indivíduos com síndrome da

imunodeficiência adquirida (SIDA). A TB humana caracteriza-se por infecção pulmonar ou pneumonia, cujos sintomas incluem febre, tosse, hemoptise, sudorese nocturna e perda de peso; a progressão da doença resulta em pioria desta sintomatologia e dispneia e a falta de tratamento pode conduzir à morte (Suehiro, 2008). Já em pessoas imunocompetentes, de acordo com Möbius *et al.* (2006) os membros de MAC causam infecções pulmonares crónicas em idosos, linfadenite cervical em crianças e infecções diversas localizadas em tecidos moles, mas raramente provocam doença disseminada. Todavia, as fontes da infecção por MAC permanecem incertas, tendo sido então sugerido que a proveniência primária de infecção seja o ambiente em detrimento da transmissão directa entre indivíduos. Outra origem discutida por Möbius *et al.* (2006) é então alimentos contaminados provenientes de suínos ou outros animais de gado.

1.4. Linfadenite granulomatosa suína

A TB continua a provocar perdas económicas significativas em suiniculturas em todo o mundo, pois embora a bactéria *M. bovis* tenha sido praticamente erradicada em muitos países desenvolvidos, continuam a ser documentadas lesões nos GL cervicais e mesentéricos em suínos durante a IS; além disto, representa um potencial risco para a saúde pública, uma vez que ainda não são conhecidas todas as possíveis interacções entre o agente, os hospedeiros e o meio ambiente (Oliveira, 2005; Pavlik *et al.*, 2005; Morés *et al.*, 2007; Lara *et al.*, 2011; Stepanova *et al.*, 2011). Estas perdas económicas elevadas devem-se não só à rejeição total ou parcial das carcaças, mas também a patologias reprodutivas graves associadas a micobactérias que podem resultar em abortos (Eisenberg *et al.*, 2012), além disto, há a limitação ou proibição da venda e movimentação de animais vivos para fora de explorações infectadas (Moravkova *et al.*, 2007). Segundo Thoen (2006) e Resende *et al.* (2008), o processamento de carcaças tuberculosas é moroso e resulta em elevadas perdas financeiras. Os regulamentos do *Meat and Poultry Inspection Program do United States Department of Agriculture* (USDA) requerem que as porções não afectadas das carcaças de suínos com lesões tuberculosas em mais de um local primário, como GL mesentéricos e cervicais, sejam tratadas termicamente a 76.7 °C durante 30 minutos antes de serem aprovadas para consumo humano e o valor de uma carcaça cozida é apenas cerca de 20-25% do de uma não cozida (Pavlik *et al.*, 2003; Thoen, 2006). Em matadouros que não têm estas instalações e equipamentos disponíveis, a carcaça é inteiramente rejeitada, sendo a perda ainda maior (Thoen, 2006). Não existe qualquer programa de erradicação da TB em suínos, como acontece com os bovinos; assim, a percentagem de suínos com lesões tuberculosas é elevada (Oliveira, 2005; Thoen, 2006). Na República Checa, 22-24% das perdas nos matadouros consistem em suínos nos quais se detectaram lesões tuberculosas ou tuberculoides (Shitaye *et al.*, 2006). Segundo Oliveira (2005) e Möbius *et al.* (2006), é bastante notório na literatura a decrescente ocorrência de *M. bovis* como etiologia de tais lesões, acompanhada pelo aumento de isolados de representantes do MAC. Este facto pode dever-se à crescente tecnicização da suinicultura, tendo como consequência a redução do contacto directo ou indirecto com bovinos, ao mesmo tempo que oferece o estabelecimento de ciclos dinâmicos de

transmissão de novos agentes (Oliveira, 2005). No sul do Brasil, estima-se que *M. avium* é responsável por 96.4% das micobacterioses ocorridas (Resende *et al.*, 2008).

Segundo Pavlik *et al.* (2003), Shitaye *et al.* (2006) e também Thoen (2006), os suínos são susceptíveis à infecção com MAC, complexo *M. tuberculosis*, *M. bovis* e micobactérias condicionalmente patogénicas (CPM). O MAC inclui um grupo heterogéneo de bacilos de crescimento lento divididos em duas espécies (*M. avium* e *M. intracellulare*) que podem causar diversas doenças em animais e humanos (Möbius *et al.*, 2006; Pate *et al.*, 2008), serologicamente classificadas em 28 serotipos diferentes (Oliveira, 2005). Acredita-se que os microrganismos pertencentes ao MAC sejam ubiquitários pois, como já foi referido numa secção anterior, são frequentemente isolados da água, plantas e solo e estão distribuídos por todo o mundo (Oliveira, 2005; Pate *et al.*, 2008). *Mycobacterium avium* foi posteriormente dividido em três subespécies, considerando a sua patogenicidade, amplitude de hospedeiros e características fenotípicas e genotípicas (Möbius *et al.*, 2006; Pate *et al.*, 2008): *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*. Por outro lado, as estirpes de *M. avium* mais frequentemente isoladas em suínos com alterações tuberculosas nos GL e em humanos com infecção respiratória ou disseminada foram propostas como *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH); estas são debilmente virulentas para aves, mas são patogénicos oportunistas de animais e humanos (Pavlik *et al.*, 2003; Möbius *et al.*, 2006; Pate *et al.*, 2008). Os suínos podem estar concomitantemente infectados com MAA e MAH (Pavlik *et al.*, 2005). Do ponto de vista veterinário, o agente causativo da TB aviária (MAA) é completamente virulento para aves e provoca TB miliar; *M. intracellulare* e MAH apenas originam lesões tuberculosas no local de inoculação após infecção intramuscular e são praticamente não-virulentos para aves (Möbius *et al.*, 2006; Moravkova *et al.*, 2007; Pate *et al.*, 2008). De acordo com Möbius *et al.* (2006), na Alemanha MAA perdeu a sua relevância para aves domésticas devido às explorações intensivas, mas é ainda de importância clínica em aves exóticas em jardins zoológicos e aves de estimação. Segundo Shitaye *et al.* (2006), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* foi ocasionalmente detectado em suínos domésticos na Suécia, Espanha e Estados Unidos da América (EUA) e em javalis silvestres na República Checa; *M. avium* subsp. *silvaticum* ainda não foi detectado em suínos e é virulento para aves, sendo principalmente isolado de pombos silvestres. Segundo Oliveira (2005), 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*, *M. flavescens* e *M. fortuitum*. Eisenberg *et al.* (2012) inclui ainda *M. porcinum* e *M. palustre* e Lara *et al.* (2011) abrange *M. szulgai*, *M. simiae* e *M. nonchromogenicum*. Num estudo efectuado na República Checa entre os anos de 1996 e 2004 pelos autores Pate *et al.* (2008) foram detectadas várias lesões macroscópicas em 93.1% dos animais analisados: adenopatia em 4.1% e lesões tuberculosas caseosas em 55.8% e calcificadas em 33.2%. A coloração Ziehl-Neelsen (ZN) para bacilos álcool-ácido resistentes foi positiva em 56.4% dos tecidos analisados: 14.5% em animais sem lesões macroscópicas, 18.7% em animais com adenopatia, 39.5% em animais com caseificação e 75.98% em animais com calcificação. Foram ainda isoladas micobactérias dos tecidos de 15.8% dos animais com ZN negativa e de 72.5% dos suínos com ZN positiva; destes isolados, 94.6% foram classificados como membros do MAC (29.7% MAA, 56.4% MAH e os restantes 3.3% de várias espécies como *M. chelonae*, *M.*

smegmatis, *M. xenopi*, *M. terrae*, *M. aurum*, *M. scrofulaceum* e *M. fortuitum*). Resultados semelhantes foram obtidos na Eslovénia (Pate *et al.*, 2008). Pavlik e os seus colaboradores (2003) detectaram um total de 94.8% de isolados de MAC (55.7% MAA, 39.2% MAH e 5.1% CPM incluindo várias espécies). Noutro estudo realizado também na República Checa por Matlova *et al.* (2004), foram detectadas lesões tuberculosas nos GL de 3.6% dos suínos, mais frequentemente nos mesentéricos (2.4%) e da cabeça (1.8%), em concordância com Pavlik *et al.* (2003). Todavia, num estudo holandês conduzido por Komijn *et al.* (2007), os valores foram invertidos: 7.7% dos animais exibiam lesões granulomatosas nos GL submaxilares e 0.1% nos mesentéricos. Num estudo na Suíça efectuado por Komijn *et al.* (1999), foi isolado *M. avium* dos GL mesentéricos de suínos saudáveis sem qualquer lesão. Na Holanda, foi observada uma elevada incidência de lesões caseosas em suínos na altura do abate, estando cerca de 0.5% dos animais afectados; foram isoladas bactérias do MAC em 54.2% dos GL lesados (Komijn *et al.*, 1999). Em 2004, a prevalência de lesões granulomatosas nos GL aumentou para 0.75%, não tendo sido porém detectadas bactérias do MAC (Komijn *et al.*, 2007). Assim, segundo Pavlik *et al.* (2005), Shitaye *et al.* (2006) e Morés *et al.* (2007), as causas da formação de granulomas poderão ser outras espécies bacterianas como *Rhodococcus equi*. Também isto é mencionado por Eisenberg *et al.* (2012). Embora Pavlik e seus colaboradores (2003) tenham isolado *R. equi* em somente 8.8% de animais e em mais 2.8% quando associado a micobactérias (sobretudo em GL da cabeça), no estudo holandês já supracitado *R. equi* foi isolado de 44.9% dos GL submaxilares com lesões granulomatosas e ainda de dois GL mesentéricos sem lesões (Komijn *et al.*, 2007); isto indica que a prevalência de infecções por MAA em suínos tem decrescido bastante na última década enquanto *R. equi* tem sido bastante predominante. Num estudo brasileiro realizado por Lara e seus colaboradores (2011), em casos de linfadenites suínas as bactérias pertencentes ao género *Mycobacterium* foram isoladas em 24.1% dos GL e *R. equi* em 13.2% dos mesmos, sendo estes os microrganismos mais prevalentes; em GL sem lesões foram identificados diversos microrganismos, incluindo micobactérias ambientais. Em javalis selvagens com a mesma patologia, *Mycobacterium* spp. estava presente em 8.4% dos GL e *R. equi* em 6.6%, também os microrganismos mais comumente isolados, em concordância com o estudo anterior. Também na República Checa *R. equi* foi isolado de 8.8% dos animais e em 2.8% em combinação com micobactérias (Pavlik *et al.*, 2005). A elevada incidência de lesões granulomatosas associadas à presença de *R. equi* pode ser considerada como uma causa de diagnóstico errado de infecções por MAA em casos em que a inspecção sanitária é executada apenas com base na observação macroscópica de alterações granulomatosas nos GL.

Segundo Thoen (2006), o desenvolvimento da doença nos suínos depende da capacidade de multiplicação dos bacilos nos tecidos do hospedeiro e de indução de uma resposta por parte do mesmo. Embora inicialmente esta resposta seja por meio de granulócitos e componentes humorais, os macrófagos mononucleares activados são considerados os mais importantes na protecção do animal portador contra as micobactérias. De acordo com Morés e Silva (2001) e Thoen (2006), a aptidão de *M. avium* na produção de patologia progressiva pode estar relacionada com determinados lípidos complexos presentes na parede celular (ex: glicopeptidolípidos localizados na porção exterior do envelope celular). A informação disponível sugere que uma combinação de lípidos tóxicos e

factores de virulência dos bacilos pode causar ruptura do fagossoma, interferir com a formação do fagolisossoma, alterar a libertação de enzimas hidrolíticas por parte dos lisossomas e/ou inactivar as enzimas lisossomais segregadas para o vacúolo citoplasmático. Algumas estirpes de *M. avium* são susceptíveis aos mecanismos bactericidas dos macrófagos, sendo inactivadas no seu interior e, por isso, não patogénicas (Thoen, 2006; Suehiro, 2008). Estudos experimentais em leitões revelaram um aumento da actividade de esterase inespecífica em macrófagos mononucleares nos GL 7 dias após inoculação de um membro de MAC; foram observados granulomas em diversos estágios nos GL mesentéricos e mandibulares e na mucosa intestinal 14 dias pós-inoculação. Noutras investigações, linfócitos sensibilizados e anticorpos micobacterianos foram documentados 14-28 dias pós-exposição a *M. avium* ou *M. bovis* (Thoen, 2006; Suehiro, 2006).

Como é observado nos matadouros, as lesões tuberculosas de suínos são geralmente limitadas aos GL das regiões cervicais e mesentéricas; estas podem variar desde pequenas, brancas ou amareladas, com focos caseosos e poucos milímetros (mm) de diâmetro até aumento difuso de todo o GL (Oliveira, 2005; Morés *et al.*, 2007; Suehiro, 2008). De acordo com Thoen (2006), a doença pode estar localizada num grupo de GL ou pode envolver uma pluralidade de GL ao longo do tracto gastrointestinal (TGI). Num estudo brasileiro de 2007 executado por Morés e seus colaboradores, os GL da cadeia alimentar (cefálicos e/ou mesentéricos) foram os mais afectados, surgindo em 95.2% das carcaças; em 4.5% das mesmas observaram-se lesões simultaneamente em ambos e apenas numa carcaça estes GL não estavam envolvidos, descobrindo-se lesões isoladas nos GL inguinais. A diferenciação macroscópica entre linfadenite tuberculosa causada por bacilos aviários e de mamíferos é difícil, mas existem aspectos característicos (Thoen, 2006). Numa infecção de origem aviária, os GL podem estar aumentados e firmes, sem focos purulentos ou poderão existir uma ou mais áreas ligeiramente caseosas com bordos pouco distintos; a calcificação é raramente presenciada. A superfície de corte da lesão tem aparência neoplásica com poucos focos caseosos; embora possa existir fibrose difusa, há pouca tendência para encapsulamento. Podem ser observadas áreas relativamente grandes de caseificação, que ocasionalmente envolvem todo o GL; nestes casos, as lesões geralmente não são facilmente enucleadas. Pelo contrário, quando a infecção é devida a *M. tuberculosis* ou *M. bovis* as lesões tendem a ser encapsuladas e são relativamente fáceis de separar do tecido circundante. Ademais, a calcificação é usualmente proeminente e os focos individuais são discretos e caseosos. Porém, estas distinções não são de modo algum absolutas e podem ser observadas variações na aparência macroscópica das lesões tuberculosas dos GL dos suínos. Microscopicamente, as alterações induzidas por *M. avium* nos tecidos dos animais são descritas como proliferação difusa de células epitelióides e gigantes, podendo notar-se necrose e calcificação, especialmente em lesões mais antigas, mas geralmente esta calcificação não é considerável; este processo é acompanhado por proliferação de elementos do tecido conjuntivo. As lesões infligidas por bacilos de mamíferos têm tendência a tornarem-se encapsuladas por uma zona bem desenvolvida de tecido conjuntivo; além disso, geralmente é notada caseificação precoce e calcificação marcada. Contudo, esta diferenciação histopatológica não é sempre possível. A TB generalizada não é frequente em suínos; a maioria das vezes resulta de infecção por *M. bovis*, mas também pode ser devida a *M. avium*. A extensão e carácter do

envolvimento geral variam desde a ocorrência de alguns pequenos focos em vários órgãos até um processo nodular extensivo que abarca fígado, baço, pulmões, rins e múltiplos GL. As lesões generalizadas devido a infecção com *M. avium* tendem a ser difusas; a superfície de corte é vulgarmente branda e não é comum encapsulamento por fibrose. Podem ser observados focos de caseificação, mas a calcificação não é pronunciada. As lesões resultantes de infecção com bacilos de mamíferos são frequentemente discretas, caseosas e bem circunscritas por fibrose com calcificação evidente (Morés e Silva, 2001; Thoen, 2006; Morés *et al.*, 2007).

A bactéria *R. equi* é também associada a linfadenite granulomatosa, afectando GL da cabeça e pescoço de suínos; no matadouro as lesões são facilmente confundidas com TB, sendo este organismo mais importante por esta razão do que pela causa de doença com manifestações clínicas (Thoen, 2006; Ribeiro *et al.*, 2011). *Rhodococcus equi* é um cocobacilo aeróbio Gram positivo não-móvel cujo isolamento é facilmente executado por cultura aeróbia em meio padrão de rotina a 37 °C, embora a temperatura óptima seja 28-30 °C (Makrai *et al.*, 2002; Pate *et al.*, 2004; ; Makrai *et al.*, 2005; Taylor, 2006; Ribeiro *et al.*, 2011). As colónias são de crescimento lento e, às 24 horas de incubação, são pequenas (1-2 mm de diâmetro) e pouco distintas; as colónias típicas aparecem após 48 horas (2-4 mm) e são irregularmente redondas, alaranjadas, pálidas, semi-transparentes, suaves, brilhantes e mucóides, com tendência para coalescer, embora seja comum variação entre estirpes. A coloração rosa-salmão característica pode aparecer apenas aos 4-7 dias (Pate *et al.*, 2004). *Rhodococcus equi* é catalase-positivo, urease-positivo e oxidase-negativo; não é geralmente considerado hemolítico, embora tenha sido recentemente isolado *R. equi* hemolítico na Eslovénia (Pate *et al.*, 2004). Esta bactéria possui uma cápsula polissacárida acidificada; conforme Taylor (2006) e Ribeiro *et al.* (2011), estudos recentes sobre esta espécie confirmam que os isolados de suínos contêm uma proteína associada a virulência (*Vap*), codificada por um plasmídeo de virulência. Pelo menos três níveis de virulência são reconhecidos entre as diversas estirpes: virulentas, com virulência intermediária e não virulentas (Makrai *et al.*, 2002; Makrai *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2011). Os isolados virulentos de *R. equi* são caracterizados pela presença de um plasmídeo associado à expressão de antigénios *VapA*, uma proteína associada a virulência de peso molecular entre 15 e 17 kDa; estes são identificados como a principal causa de pneumonia supurativa em poldros. As estirpes com virulência intermediária apresentam antigénios *VapB* de 20 kDa e têm sido mais documentadas em linfadenites de suínos domésticos, javalis selvagens e pacientes humanos com SIDA, não se conhecendo, no entanto, história de contacto entre as pessoas infectadas e ambientes habitados por porcos ou mesmo criadores de suínos. Em contraste, as estirpes não virulentas não mostram evidência de *VapA* nem de *VapB* e são maioritariamente reportadas em humanos com rhodococcose e co-infecção com VIH, no ambiente de poldros e no solo (Ribeiro *et al.*, 2011). Segundo Makrai *et al.* (2002), Makrai *et al.* (2005) e Makrai *et al.* (2008), a maioria dos isolados de *R. equi* de pacientes com SIDA são virulentos, isto é, positivos para *VapA* ou *VapB*, enquanto a maior parte dos isolados de pacientes imunocomprometidos sem SIDA são não virulentos. Ainda num estudo de 2008 de Makrai *et al.*, 25.6% dos isolados de *R. equi* derivados de GL submaxilares colhidos de carcaças de javalis selvagens foram positivos para o gene *VapB* e os restantes 74.4% eram não virulentos sem qualquer gene *Vap*; estes animais poderão funcionar como reservatórios de *R. equi* assim como para outras

bactérias patogénicas, incluindo espécies do género *Mycobacterium*. Os factores de virulência incluem polissacáridos capsulares, exoenzima colesterol-oxidase, fosfolipase C, lecitinase parede celular e ácidos micólicos (Makrai *et al.*, 2002). Segundo Makrai *et al.* (2002) e Taylor (2006), *R. equi* é primariamente residente do solo, principalmente em pasto de herbívoros, já que potencia a multiplicação bacteriana; é ainda habitante transitório do TGI de muitas espécies, incluindo suínos, bovinos, equinos, ovinos, caprinos e aves silvestres. Sendo um aeróbio obrigatório, não é um membro provável da flora intestinal normal; a bactéria é encontrada em amostras de solo de pasto não usado por vários anos, o que enfatiza a sua durabilidade e elevada capacidade de sobrevivência no meio ambiente. *R. equi* está presente na poeira das explorações onde ocorre, sendo relativamente resistente a desinfectantes químicos, como tratamento com ácido oxálico a 2.5% e hidróxido de sódio a 0.5% por períodos de 15-60 minutos. Não existe muita informação sobre a epidemiologia ou patogénese da doença em suínos, mas em cavalos é provavelmente adquirida pelo ambiente, sendo a ingestão o meio de transmissão normal em poldros, que conduz ao desenvolvimento de uma sólida imunidade protectora na maioria dos animais (Taylor, 2006). A maioria dos casos de infecção por *R. equi* é diagnosticada durante Verões quentes e secos; não só são estas as condições ideais para a multiplicação bacteriana, mas também são épocas que propiciam a formação de ambientes poeirentos, o que conduz à inalação de partículas de pó contaminadas por parte dos poldros (Meijer e Prescott, 2004). A situação é presumivelmente semelhante em suínos de explorações contaminadas com *R. equi*, já que este é prontamente isolado das fezes destes animais (Makrai *et al.*, 2002). Vários estudos em matadouros demonstraram o isolamento de *R. equi* de GL cervicais e submaxilares normais, com taxas entre 7 e 35% (Taylor, 2006). Makrai *et al.* (2005) reporta taxas de 45.6% de isolamento de *R. equi* de GL submaxilares de suínos com lesões e ainda 9.4% de GL sem lesões. No entanto, segundo Taylor (2006) não existem estudos epidemiológicos que correlacionem as taxas de infecção com a prevalência da doença e a contaminação ambiental em explorações porcinas. É possível que a gravidade das lesões reflecta a posse da VapA (que varia de estirpe para estirpe), o grau de imunidade presente aquando da infecção ou a duração da mesma; porém, *R. equi* tipicamente provoca uma reacção granulomatosa nos GL o que é coerente com a sua acção de patógeno intracelular facultativo (Makrai *et al.*, 2002; Taylor, 2006). De acordo com Taylor (2006), a bactéria *R. equi* é associada a doença clínica severa, incluindo surtos de abscessos orais e pneumonia, mas os porcos são extremamente resistentes à infecção experimental, apresentando sintomatologia e lesões patológicas mínimas, apesar da bactéria ser lentamente eliminada dos pulmões (transmissão por aerossóis). Já em poldros esta bactéria está associada a lesões pulmonares piogranulomatosas, o que reflecte a sua habilidade para sobreviver dentro dos macrófagos, uma característica partilhada com o género *Mycobacterium*; assim se entende que são espécies bastante relacionadas. A base da patogenicidade de *R. equi* é, desta forma, a sua capacidade de multiplicação dentro dos macrófagos alveolares e, eventualmente, a destruição dos mesmos (Meijer e Prescott, 2004). A linfadenite não provoca sinais clínicos significativos e as lesões são detectadas apenas no abate. Os GL submandibulares e cervicais atingidos estão aumentados, apresentam múltiplos focos amarelos escuros, frequentemente em localização subcapsular, ocorrendo por vezes caseificação e calcificação destes; histologicamente, a lesão é uma linfadenite

granulomatosa (Taylor, 2006). Foram documentadas lesões similares em GL mesentéricos infectados com *Rhodococcus sputi*. Um estudo dirigido por Ribeiro e seus colaboradores (2011) demonstrou que a frequência de infecção nos GL submaxilares é bastante superior à descoberta em GL mesentéricos, reforçando a via oral como maior rota de transmissão da bactéria nesta espécie, provavelmente ligada ao consumo de água ou alimentos contaminados com *R. equi* do solo. Recentemente, *R. equi* tem então emergido como patógeno pulmonar em pacientes humanos imunodeprimidos, particularmente aqueles que sofreram transplante ou se encontram infectados pelo VIH, sendo que aproximadamente dois terços dos pacientes com rhodococose estão simultaneamente infectados com VIH; porém o papel de suínos domésticos na sua transmissão para outros animais e humanos permanece por clarificar (Makrai *et al.*, 2002; Meijer e Prescott, 2004; Makrai *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2011). Todavia, novas evidências testemunharam que o consumo de produtos derivados de carne de suíno ou mesmo carne de porco mal cozinhada poderá ser uma possível via de infecção de *R. equi* em humanos (Makrai *et al.*, 2005; Makrai *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2011). Num estudo realizado na Hungria em 2002 por Makrai *et al.*, a maioria das amostras recolhidas do solo (estábulo e ambiente circundante) e de poldros com sinais clínicos de pneumonia por *R. equi* foi positiva para o gene *VapA*; contrariamente, as amostras provenientes de suínos (GL mandibulares) e pacientes humanos imunocomprometidos (expectoração, sangue, lesão torácica, úlcera e lavado traqueal) foram maioritariamente positivas para *VapB*. Num estudo seguinte dos mesmos autores (2005), de 1173 GL submaxilares sem lesões macroscópicas recolhidos de suínos, foram isoladas 164 culturas de *R. equi* e nenhuma delas continha o gene *VapA*; de acordo com a investigação anterior, um total de 44 estirpes (26.8%) expressava o gene *VapB* e 120 eram mesmo não virulentas. Este estudo revelou ainda que *R. equi* se encontra espalhado pelos GL submaxilares de porcos saudáveis (média de 14% dos animais).

O diagnóstico clínico de TB suína é presuntivo já que as lesões são limitadas a pequenos focos em alguns GL do TGI e, desta forma, não é concebível que estas alterações mórbidas não-progressivas despoletem sinais detectáveis no exame físico, sendo detectadas somente após o abate (Silva *et al.*, 2000; Oliveira, 2005; Resende *et al.*, 2008; Suehiro, 2008). O complexo primário é dificilmente identificável pela inspeção macroscópica, mas microscopicamente podem ser observados tubérculos na mucosa da faringe e intestino delgado, enquanto as lesões macroscópicas são vistas mais amiúde nos GL cervicais e mesentéricos, embora possam ser atingidos outros órgãos (Morés *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2008; Suehiro, 2008). Segundo Thoen (2006), em caso de extensa infecção os sintomas podem ser sugestivos de uma doença infecciosa, mas não são suficientemente característicos para estabelecimento de um diagnóstico de TB. Ademais, a linfadenite granulomatosa trata-se de uma doença de evolução crónica em que as lesões são visualmente identificadas apenas 2 a 4 meses após a contaminação ter ocorrido (Resende *et al.*, 2008). O teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foi descrito para detecção de anticorpos em suínos infectados com MAC, já que reacções positivas foram observadas em porcos infectados experimental e naturalmente. A mera demonstração de bacilos álcool-ácido resistentes pode não ser suficiente, já que *R. equi* também o é (Thoen, 2006). Os aspectos patológicos característicos de TB e a presença de reacção positiva à coloração ZN fornecem indicações importantes, mas o diagnóstico inequívoco

de TB apenas é alcançado com procedimentos bacteriológicos para isolamento e identificação por testes bioquímicos e de seroaglutinação e/ou técnicas moleculares. No estudo holandês já mencionado (Komijn *et al.*, 1999), a cultura de *M. avium* é considerada o teste de eleição para o diagnóstico de infecções micobacterianas porcinas; porém, a coloração ZN foi também boa na sua detecção (80-82%), apesar de 81% das amostras positivas terem resultados negativos na cultura de MAC (falsos positivos). Margolis *et al.* (1994) encontraram uma sensibilidade de 86% para o exame histopatológico e apenas de 15% para a coloração ZN, considerando o isolamento de micobactérias como o teste padrão, concordando com Komijn *et al.* (1999); neste estudo foi possível encontrar bacilos álcool-ácido resistentes em 72.8% dos GL com lesões granulomatosas no exame histológico. Considerando Morés *et al.* (2007), as desvantagens do isolamento do agente etiológico passam pela exigência de procedimentos laboratoriais especiais, ser muito demorado, ter baixa sensibilidade e ter custos de execução elevados. Este autor aponta a imunohistoquímica (IHQ) associada ao exame histopatológico, uma vez que estes poderão fornecer um diagnóstico etiológico seguro e rápido, favorecendo a tomada de decisão. Ainda nesta investigação, houve uma concordância de 75.4% entre o exame histopatológico e a presença de bacilos álcool-ácido resistentes nas lesões. Dos 112 suínos em que bactérias do MAC foram isoladas, 93 (83%) foram positivos e 19 (17%) negativos no teste de IHQ; todavia, os 93 suínos cujos GL apresentaram lesões caracterizadas por granulomas típicos com necrose de caseificação e/ou mineralização foram todos positivos no teste de IHQ e os 19 sem granuloma típico de infecção por micobactérias foram todos negativos. Por outro lado, dos 104 suínos em que MAC não foi isolado, 73.1% foram positivos e 26.9% negativos no teste de IHQ e, destes 73.1%, apenas 2.6% não apresentavam lesões granulomatosas típicas da infecção por micobactérias. Assim, podemos concluir que, quando comparamos os exames de IHQ e isolamento de membros do MAC, há fraca concordância entre ambos; porém, há forte concordância entre os exames de IHQ em cortes de tecidos e a presença de lesões histopatológicas caracterizadas pela presença de granulomas típicos nos GL. A reacção positiva no teste de IHQ estava localizada na massa necrótica no interior dos granulomas, principalmente no citoplasma de macrófagos degenerados, localizados na periferia das áreas de necrose e/ou mineralização. Isto sugere que o anticorpo utilizado identifica antígenos de secreção do MAC que são fagocitados pelos macrófagos. Então estes resultados indicam que o exame histopatológico com presença de granuloma típico e necrose e mineralização da massa necrótica seguido do teste de IHQ com o anticorpo monoclonal será o procedimento mais adequado para o diagnóstico da linfadenite por MAC, sendo seguro, rápido e económico. No entanto, há que considerar que estas lesões macroscópicas e microscópicas não são diferentes das provocadas por *M. bovis* ou *M. tuberculosis*, por exemplo, não sendo portanto o exame histopatológico suficiente para identificar as espécies de micobactérias. Os dados epizootiológicos podem fornecer informações mais conclusivas sobre a etiologia das lesões granulomatosas encontradas nos GL de suínos na linha de abate: a presença de lesões limitadas ao GL do TGI, a origem dos suínos ser uma exploração fechada (intensiva) sem contacto com outros mamíferos e a ausência de produtos lácteos na dieta são sugestivos de infecção por MAC. Por exemplo, *M. bovis*, além de afectar órgãos parenquimatosos como os pulmões, usa a via respiratória como principal rota de infecção. O teste da tuberculina para diagnóstico de TB em vida em suínos

parece um procedimento útil em termos de grupo (Morés *et al.*, 2007; Stepanova *et al.*, 2011). Porém, segundo Morés e Silva (2001), Thoen (2006) e Stepanova *et al.* (2011), alguns animais com TB podem não reagir ao teste intradérmico (ID), demonstrando então uma sensibilidade baixa; assim, os testes devem ser repetidos em explorações com animais positivos. O teste ID é geralmente efectuado na orelha ou vulva e, uma vez que os suínos são susceptíveis à infecção com complexo *M. tuberculosis* e MAC, deve ser empregue tuberculina aviária e de mamífero (Thoen, 2006; Morés *et al.*, 2007; Stepanova *et al.*, 2011). Estão descritos vários tipos de testes que variam em termos de quantidade de tuberculina a injectar, local de injeção e leitura de reacção positiva; actualmente é recomendada a injeção ID de tuberculina na superfície dorsal das orelhas, sendo este local observado 48 horas depois.

A erradicação da TB em suínos, assim como noutras espécies, está dependente da disponibilidade de meios económicos e da detecção de animais infectados; desta forma, segundo Thoen (2006), é necessária informação que dite as medidas adequadas para limpeza e desinfecção em casos em que MAC persiste no solo, edifícios ou equipamentos. Além disso, é vital conhecer o tempo de viabilidade destes organismos no ambiente. Num estudo efectuado recentemente na Finlândia (Shitaye *et al.*, 2006; Pakarién *et al.*, 2007), foi demonstrado que a turfa (forma de carvão mineral usada como suplemento para leitões) e outros materiais orgânicos podem conter elevado conteúdo de micobactérias, particularmente MAH. Matlova *et al.* (2004) e Pavlik *et al.* (2005) afirmam que a incidência de lesões tuberculosas aumentou na República Checa entre os anos de 1998 e 1999, altura em que os leitões começaram a ser alimentados com dietas que continham turfa como suplemento. Noutro estudo executado por Matlova *et al.* (2004), considerando a localização das lesões tuberculosas, ficou reportado que os animais são infectados primariamente por ingestão; após o desmame dos leitões foi observada ingestão da serradura das camas pelos mesmos, onde era elevada a prevalência de MAH. O armazenamento ou manuseamento inadequado da serradura podem permitir a propagação de CPM. Matlova *et al.* (2004) e Pavlik *et al.* (2005) atestam que a prevalência de granulomas tuberculosos dilatou na República Checa no ano de 1995 quando se introduziu a serradura como material constituinte das camas; apesar de se terem aplicado várias enzimas para a degradação biológica do material de madeira, estas não foram capazes de desvitalizar ou prevenir a propagação de micobactérias atípicas, subseqüentemente isoladas de amostras de serradura e GL de suínos com lesões tuberculosas. Ainda a detecção de *M. fortuitum* e *M. gordonae* no sedimento da água de beber indicou a sua contaminação (Morés e Silva, 2001; Resende *et al.*, 2008; Eisenberg *et al.*, 2012). Entre os anos de 1996 e 2002 foi realizado um estudo por Matlova *et al.* (2003) na República Checa no qual foram investigadas as possíveis fontes de infecções por micobactérias. Neste estudo, foram isolados de órgãos de aves quer MAA quer MAH, além de outras espécies; desta forma, é desejável proteger os animais do contacto com aves ou fezes de aves, assim como evitar a contaminação das camas, rações e água (Matlova *et al.*, 2003; Oliveira, 2005; Resende *et al.*, 2008; Eisenberg *et al.*, 2012). Ainda neste estudo, o material mais contaminado era a turfa, já que o seu baixo pH favorece a sobrevivência de micobactérias, que têm crescimento optimizado com pH entre 5 e 5.5; também foi revelada uma elevada ocorrência de CPM quer na água de beber quer em biofilmes (Matlova *et al.*, 2003; Resende *et al.*, 2008; Suehiro, 2008;

Eisenberg *et al.*, 2012). Na mesma pesquisa, o material usado para camas com maior taxa de isolamento de micobactérias foi a serradura, sendo MAH a micobactéria mais comumente isolada (Matlova *et al.*, 2003; Oliveira, 2005; Eisenberg *et al.*, 2012). A contaminação das rações era menos exuberante e os isolados eram predominantemente de MAH; os meses de Verão demonstraram ainda ser os mais críticos, uma vez que as micobactérias se propagam rapidamente em condições de humidade aumentada. Os suplementos alimentares caulino e carvão vegetal podem ser classificados como fontes menos constantes de infecção por micobactérias. Pelo contrário, os isolados de micobactérias de fezes de suínos foram bastante frequentes neste estudo, sendo deste modo uma origem de contaminação para as paredes e para o chão da exploração (Matlova *et al.*, 2003). Um estudo dos mesmos autores no ano seguinte (Matlova *et al.*, 2004) sugere, todavia, o contrário relativamente ao suplemento caulino, usado como medicação no tratamento de diarreia e problemas intestinais em leitões após o nascimento e o desmame, devido à sua elevada capacidade de absorvência e natureza não tóxica. Neste estudo foi detectada TB nos GL de suínos suplementados com caulino mais frequentemente (16.1%) do que no grupo-controlo (2.4%), e mais comumente as lesões eram encontradas nos GL intestinais do que nos GL da cabeça. Ainda foi detectado MAH em amostras de caulino dessa mesma exploração (2.3%). No entanto, é de notar que este suplemento não pertence ao grupo das fontes mais prováveis de micobactérias. Quando a suplementação com caulino cessou, houve um ligeiro declínio na ocorrência subsequente de lesões tuberculosas em GL no matadouro. Uma vez que o caulino é um mineral com um conteúdo nutritivo mínimo e já que não são adicionados nutrientes propositadamente durante a sua produção, a contaminação com micobactérias pode ser controlada durante o fabrico ao ser embalado imediatamente em embalagens de vácuo; o risco poderá ser ainda mais reduzido durante o seu armazenamento a longo-prazo abaixo dos 18 °C, uma vez que a propagação destas bactérias no ambiente exterior não acontece nestas condições. Outro reservatório natural de micobactérias em explorações porcinas é o solo, que acusou uma alta prevalência de CPM e espécies não patogénicas de micobactérias, podendo ainda agir como fonte de *R. equi* (Matlova *et al.*, 2003; Resende *et al.*, 2008; Eisenberg *et al.*, 2012). A poeira e as teias de aranha presentes são procedências menos salientes. Ainda os animais invertebrados podem participar como agentes veiculadores da doença; neste estudo 7.9% das amostras analisadas provenientes destes animais estavam contaminadas, sendo o isolado mais comum MAH (Matlova *et al.*, 2003). Resumidamente, a infecção micobacteriana em suínos é então frequentemente atribuída aos materiais orgânicos utilizados em explorações porcinas (Eisenberg *et al.*, 2012). Evidências recentes apontadas por Lara *et al.* (2011) demonstraram que javalis selvagens europeus (*Sus scrofa*) são importantes reservatórios do complexo *M. tuberculosis* devido à presença de microrganismos pertencentes ao mesmo nos seus GL.

De acordo com Oliveira (2005), o que não se encontra totalmente claro é se a transmissão horizontal entre suínos tem alguma importância na manutenção da doença dentro das explorações, o que implicaria uma estratégia de controlo distinta baseada no diagnóstico e eliminação dos animais positivos que funcionariam como prováveis fontes de infecção. No entanto, num estudo de 2000 realizado por Silva *et al.* constatou-se existência de transmissão horizontal. De acordo com Silva *et al.* (2000) e Resende *et al.* (2008) foi demonstrado que os suínos infectados eliminam micobactérias na

urina e nas fezes durante um longo intervalo de tempo (16 a 65 dias após a infecção), com maior intensidade entre 35 a 42 dias após a infecção. Isto sugere que o mecanismo de transmissão é a ingestão de fezes de suínos que se encontram em período de eliminação do agente ou de elementos contaminados com essas fezes como por exemplo água e ração (Silva *et al.*, 2000; Moravkova *et al.*, 2007). A eliminação do agente, constante ou não, promove assim a contaminação do ambiente (instalações, ração, água) o que aumenta as probabilidades de suínos não infectados entrarem em contacto com a bactéria (Silva *et al.*, 2000; Morés e Silva, 2001). Neste caso, os programas de controlo devem basear-se em medidas profiláticas de higiene e desinfecção, como manter os comedouros e bebedouros limpos, fornecer aos animais água tratada ou potável, manter as instalações em bom estado de conservação para facilitar a higienização, não transportar ração ou seus componentes no mesmo camião que transporta os porcos, evitar o acesso de animais ao local de depósito de rações e usar calçado e instrumentos específicos para este local, armazenar as rações em silos, sacos fechados ou caixas com tampa e trabalhar com sistema de produção em lotes com vazio sanitário. Estes procedimentos têm como finalidade reduzir a população bacteriana presente nas explorações de suínos, uma vez que *Mycobacterium* spp. pode sobreviver meses nos parques e anos no solo (Resende *et al.*, 2008). Logicamente, segundo Silva *et al.* (2000) e Oliveira (2005) a transmissão horizontal dependerá da patogenicidade da estirpe de micobactéria envolvida e da dose infectante; portanto, num possível programa de controlo seria importante a caracterização precisa das estirpes abrangidas para que se conhecesse a epidemiologia da doença e fosse estabelecido o método de controlo mais adequado. Num estudo de virulência de quatro estirpes diferentes de *M. avium* através de infecções experimentais em hamsters, os autores verificaram que a estirpe mais virulenta foi também a mais constantemente isolada de suínos em matadouro, sugerindo que esta maior virulência significa maior capacidade de perpetuação e difusão dentro da população. Assim sendo, é razoável supor que se a transmissão horizontal entre suínos existe, ela será mais comum e relevante aquando do envolvimento das estirpes mais virulentas (Oliveira, 2005). Como sugerido por Suehiro (2008), existem propostas de relação entre a virulência e as características das colónias de *M. avium* em meio sólido, sendo que as variantes lisas transparentes são mais virulentas que as lisas opacas. As primeiras predominam em amostras clínicas, crescem melhor em macrófagos e modelos animais, colonizam eficientemente as mucosas, aderem facilmente às células epiteliais e são mais resistentes a antibióticos, as últimas são isoladas do ambiente e crescem bem em meios de cultura. Um estudo checo realizado por Moravkova e seus colaboradores (2007) indicou a diminuta diversidade de isolados de MAA entre explorações não relacionadas e sem ligação epizootica plausível e que pode suceder transmissão entre elas; esta infecção pode dever-se a outros animais, como aves migratórias. A hipótese que a ração pode ser a principal fonte de MAA é refutada pelo isolamento raro de MAA do ambiente (turfa e serradura), que é usualmente a origem primordial de MAH.

Num estudo efectuado na Holanda em 1999 por Komijn *et al.*, 60% de isolados de origem porcina e humana demonstraram pelo menos 75% de similaridade. Noutro estudo finlandês mais recente foi encontrada uma similaridade ainda mais elevada (superior a 90%) em 40% dos isolados de MAH provenientes de humanos e suínos (Tirkkonen *et al.*, 2007); ainda num estudo esloveno

realizado por Pate *et al.* (2008), a semelhança evidenciada foi entre 75 e 100%. Na investigação alemã efectuada por Möbius *et al.* (2006) foram encontrados 64 isolados identificados como MAH e 23 identificados como MAA, num total de 87 isolados de *M. avium*. A similaridade encontrada entre isolados de origem humana e suína ultrapassou os 80%. Isto apoia a hipótese de uma fonte de infecção por MAH comum entre porcos e humanos, que os porcos agem como veículo para infecções humanas (Tirkkonen *et al.*, 2007) ou ainda que existem reservatórios comuns (Möbius *et al.*, 2006). É importante referir que neste caso todos os isolados de origem humana de pacientes não relacionados epidemiologicamente pertenciam à espécie MAH, não se conseguindo obter correlações genéticas entre as estirpes humanas no que cabe ao género ou idade do paciente; já 55% dos isolados animais pertenciam a MAA (Möbius *et al.*, 2006). Uma vez que existem resultados contraditórios entre estudos relativamente a esta questão, isto sugere que a identificação da subespécie reflecte mais provavelmente o diferente risco de exposição do que distinções na especificidade de hospedeiros de ambas as subespécies, pois, dependendo dos padrões socioeconómicos e condições da exploração em determinadas áreas geográficas, podem existir divergências nas taxas de incidência das subespécies em certos hospedeiros. Obviamente esta proporção discrepante pode também dever-se ao desenho dos estudos e à amostragem aleatória. De acordo com Silva *et al.* (2000), Kominjn *et al.* (2007) e Resende *et al.* (2008), os membros de MAC, particularmente MAH e MAA, são importantes agentes zoonóticos, sobretudo em humanos infectados com o VIH. Igualmente, *R. equi* é uma bactéria com potencial zoonótico, sendo então necessárias pesquisas mais detalhadas já que há o risco da transmissão desta bactéria patogénica ao Homem através do consumo de carne de suínos e javalis (Kominjn *et al.*, 2007; Lara *et al.*, 2011). Actualmente, pelo que foi presenciado nos matadouros, por rotina não é realizada a identificação laboratorial de *Mycobacterium* spp. ou *R. equi* nas lesões granulomatosas encontradas quer em GL submandibulares quer em GL mesentéricos, sendo praticamente todas as lesões deste tipo classificadas como TB. Para se obter uma prevalência adequada e acertada de *R. equi* em suínos, assim como a verdadeira incidência de *Mycobacterium* spp., seria fulcral que todas as lesões tuberculóides descobertas fossem enviadas para laboratório a fim de serem catalogadas, uma vez que a maioria das lesões provocadas por *R. equi* provavelmente é prontamente considerada TB, o que, tendo em conta os estudos mencionados acima, poderá ser falso. Desta forma, a prevalência de tuberculose poderá estar a ser erradamente sobrestimada relativamente à realidade (Resende *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2011).

Em termos legais, é importante atentar nas alíneas 1 f), q) e u) do capítulo V e E) do capítulo IX do Reg. (CE) n.º 854/2004 de 29 de Abril, segundo as quais “toda a carne de animais cuja inspecção *post-mortem* tenha revelado lesões tuberculosas localizadas em vários órgãos ou em várias partes da carcaça deve ser declarada imprópria para consumo humano. Todavia, sempre que se encontre uma lesão tuberculosa nos GL de um único órgão ou parte da carcaça, só o órgão atingido ou a parte da carcaça atingida e os respectivos GL serão declarados impróprios para consumo humano”. Como a TB suína se trata de uma doença de declaração obrigatória (DDO) a nível nacional, sempre que forem descobertas e detectadas lesões deste género o MVO deve comunicá-las e notificá-las às autoridades nacionais responsáveis, mencionando o número da exploração, a identificação do animal, a data do abate e o proprietário. Também isto é referido por

Silva *et al.* (2000), Pavlik *et al.* (2003), Pate *et al.* (2004), Moravkova *et al.* (2007) e Stepanova *et al.* (2011), ou seja, de acordo com a legislação da IS de carnes em matadouro as carcaças de animais com TB generalizada devem ser consideradas impróprias para consumo humano; em caso de lesões granulomatosas localizadas, apenas as partes do corpo ou órgãos afectados e GL adjacentes serão reprovados. Desta forma, a causa das lesões granulomatosas em GL encontradas durante a inspecção *post-mortem* no matadouro devem ser investigadas por razões epidemiológicas e de saúde pública. No entanto, um estudo realizado na Eslovénia em 2007 (Pate *et al.*, 2008) determinou que o agente causativo mais predominantemente isolado de GL de suínos pertencia realmente ao grupo das micobactérias, principalmente MAC.

Porém, para Pate *et al.* (2004) existe sempre a possibilidade de lesões granulomatosas nos GL semelhantes a TB poderem então também ser provocadas por *R. equi*, que em suínos pode causar linfadenite cervical crónica, mas que também é isolado dos GL e amígdalas em animais saudáveis e com uma frequência semelhante. No Reg. (CE) n.º 854/2004 de 29 de Abril supracitado não se encontram assentes os critérios específicos de DS em caso de lesões provocadas por *R. equi* em suínos. Ademais, a autoridade veterinária nacional considera que as lesões de linfadenite granulomatosa suína se devem na grande maioria dos casos aos agentes causativos pertencentes a MAC e só muito raramente a *M. bovis* e *M. tuberculosis*, não sendo regularmente efectuados os exames laboratoriais necessários para a confirmação desta suspeita. Segundo Wilson (2005), perante lesões compatíveis com linfadenite granulomatosa por *R. equi*, a DS a aplicar consiste apenas na remoção dos GL afectados.

1.5. Características de *Mycobacterium* spp. e de *Rhodococcus equi*

O meio sólido óptimo para isolamento de *Mycobacterium* spp. é agar enriquecido com gema de ovo e verde malaquite (Wayne e Kubica, 1986); Eisenberg *et al.* (2012) e Lara *et al.* (2011) citam o meio Löwenstein-Jensen sem piruvato como específico para *Mycobacterium* spp., suplementado com polimixina B, anfotericina, carbenicilina e trimetoprim para inibição do crescimento de flora contaminante. Por sua vez, foi descrito por Woolcock *et al.* (1979), Lechevalier (1986) e Takai *et al.* (1996) um meio selectivo para isolamento de *R. equi*, consistindo de Nutrient Agar suplementado com extracto de levedura (NAYE) e peptona, com a adição de ácido nalidíxico, novobiocina e telurite de potássio.

De uma forma geral, *R. equi* é um cocobacilo Gram negativo não móvel, positivo para urease, catalase, redução do nitrato e CAMP e negativo para os outros testes mencionados acima (Gabriels *et al.*, 2006; Komijn *et al.* 2007; Poolkhet *et al.*, 2009) – ver tabela 1 abaixo. Já o género *Mycobacterium*, como referido por Oliveira (2005), é constituído por bacilos não móveis insensíveis à coloração de Gram devido à composição distinta da sua parede celular e a maioria das espécies é de crescimento lento (2-60 dias) já que são altamente exigentes relativamente a nutrientes quando comparadas com outras bactérias patogénicas, excepto *M. tuberculosis* (14-15 horas a 37 °C). Já *M. bovis* a 37 °C demora cerca de 21 dias até o seu crescimento culminar em colónias visíveis. Estes

bacilos álcool-ácido resistentes aeróbios e não esporulados possuem entre 0.2 e 0.7 µm de largura e 1 a 10 µm de comprimento (Suehiro, 2008). Quanto à morfologia típica, *M. tuberculosis* produz colónias rugosas, elevadas, espessas, com margens finas e irregulares, cuja superfície é enrugada ou nodular, podendo ser brancas, beges ou amarelas. As colónias de *M. bovis* são pequenas, redondas e brancas, com bordos irregulares e superfície granular. As micobactérias *M. avium* e *M. intracellulare* produzem ambas colónias lisas não pigmentadas após 7 dias de incubação a 37 °C; com o envelhecimento, estas podem tornar-se amareladas (Wayne e Kubica, 1986). Relativamente ao teste da urease, *M. tuberculosis* e as micobactérias pertencentes ao complexo *M. bovis* são positivas, enquanto as referentes ao MAC são negativas; *M. tuberculosis* é positivo no teste da redução do nitrato, enquanto as outras espécies citadas são negativas. No teste da catalase, todas as micobactérias mencionadas fornecem um resultado negativo (Holt *et al.*, 2000), contrariamente a *R. equi*. O teste da oxidase não é comumente usado para determinação de micobactérias, mas sendo um grupo aeróbio, serão oxidase positivas, o que também é oposto às características de *R. equi*. As micobactérias possuem um metabolismo baseado na utilização de carboidratos; desta forma, o teste de fermentação de açúcares seria positivo (Rizwan *et al.*, 1985), o que, da mesma forma, é inverso ao presenciado em caso de contaminação com *R. equi*.

Tabela 1: Características bioquímicas utilizadas na identificação de *R. equi*.

Catalase	Positivo
Oxidase	Negativo
Mobilidade	Não móvel
Coloração de Gram	Cocobacilo Gram negativo
Urease	Positivo
Redução do nitrato	Positivo
CAMP	Positivo
Hidrólise da esculina	Negativo
Fermentação dos açúcares	Negativo

1.6. Objectivos do estudo

O objectivo primordial deste estudo efectuado no âmbito do mestrado foi a tentativa de demonstração da possível presença de *R. equi* em GL submandibulares afectados por lesões granulomatosas, recolhidos aquando da IS em matadouros (Central e Linda Rosa), em detrimento de *Mycobacterium* spp. Esta identificação foi executada de forma muito simples através de cultura e isolamento bacteriano em meio específico para *R. equi* (como descrito na secção anterior) e, em caso de crescimento bacteriano nestas placas, realização dos testes bioquímicos supracitados.

2. Materiais e métodos

2.1. Recolha das amostras

Aquando da IS pelo MVO, em dois matadouros diferentes da região Norte – Central Carnes (Vila Nova de Famalicão) e Linda Rosa (Barcelos), os 12 GL submandibulares utilizados neste estudo foram removidos minutos após o abate dos 12 suínos em questão, em três datas distintas (17 e 24 de Maio e 22 de Junho de 2011), e colocados em frascos plásticos de recolha estéreis mantidos em refrigeração para posterior transporte para o laboratório. Estes eram GL que apresentavam lesões típicas piogranulomatosas ou granulomatosas, com ou sem necrose e calcificação. Infelizmente, não foi possível obter amostras de GL mesentéricos, quer por ausência das próprias lesões nos mesmos, quer por extrema rapidez das linhas de abate que não permitem a verificação minuciosa de cada GL. Como referido na Introdução, estas são as duas localizações preferenciais para as lesões granulomatosas em suínos. Estes 12 GL foram escolhidos como amostras representativas de lesões macroscópicas de linfadenite granulomatosa, possuindo granulomas visíveis pelo MVO. Não foi possível colher mais GL lesionados devido ao tempo disponível para realização do trabalho laboratorial. Posteriormente, os GL foram submersos em água a ferver durante 3 segundos conforme descrito por Poolkhet *et al.* (2010). Uma vez que não foi possível proceder imediatamente à análise das amostras, estas foram congeladas a -20 °C, como descrito por Pavlik *et al.* (2005), Shitaye *et al.* (2006) e Lara *et al.* (2011).

2.2. Preparação de meio de crescimento e de reagentes

Foi preparado meio de cultura NANAT selectivo para *R. equi*, conforme descrito por Woolcock *et al.*, (1979) e Lara *et al.* (2011), apresentado na tabela 2.

Tabela 2: Composição do meio NANAT selectivo para *R. equi*.

Componentes	Concentração
Nutrient Agar (NA) , Pronadisa, Madrid, Espanha	14 g/L
Extracto de levedura (YE) , Lab M, Lancashire, Reino Unido)	3.0 g/L
Ácido nalidíxico (Sigma, Steinheim, Alemanha)	5 mg/mL
Novobiocina (Fluka, Steinheim, Alemanha)	0.625 mg/mL
Telurite de potássio (Fluka, Steinheim, Alemanha)	1.25 µg/mL

O meio foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos e devidamente arrefecido a 45 °C antes da adição dos suplementos, previamente esterilizados por filtração com filtros de 0.22 µm.

Neste meio, as colónias de *R. equi* são bem delimitadas, lisas, brilhantes e cor de laranja (Lechevalier, 1986). Como controlo, foi usado *R. equi* fornecido pelo CINATE. Para realização dos testes bioquímicos utilizou-se o mesmo meio sem a adição dos suplementos (NAYE).

2.3. Preparação das amostras

As amostras de GL foram deixadas a descongelar no frigorífico durante a noite, e posteriormente dissecadas, para optimização máxima apenas da zona com a(s) lesão(ões) granulomatosa(s), utilizando um cabo de bisturi com lâminas estéreis e descartáveis (Figuras 1.1 a 1.12). Após dissecação, as amostras foram colocadas de forma asséptica em sacos *Stomaker* estéreis para posterior pesagem. Os pesos foram variáveis num intervalo entre 0.17 g e 10.10 g, com uma gama bastante variável. A cada saco foi adicionado um volume de solução de Ringer (Biokar, Beauvais, França) também estéril que permitisse dissipar da melhor forma possível a amostra mas sem a diluir em demasia para ser obtida a maior concentração bacteriana possível. O tempo de agitação no *Stomaker* variou, uma vez que a massa das amostras era variável, entre 4 e 7 minutos (Figuras 2.1 a 2.3). A tentativa de isolamento de *R. equi* de cada amostra executou-se por espalhamento de 0.5 mL das suspensões obtidas em 6 placas de meio de cultura NANAT por amostra. Continuamente procedeu-se à incubação das placas durante 48 horas a 37 °C ou durante 72 horas a 30 °C (Figuras 3.1 a 3.6), dependendo do dia em que poderiam ser executados os testes bioquímicos e a coloração de Gram (Woolcock *et. al*, 1979; Takai *et. al*, 1996; Shitaye *et. al*, 2006; Makrai *et al.*, 2008; Poolkhet *et al.*, 2010).



Figura 1.1: Amostra 1 - GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 17 de Maio de 2011 no matadouro Central.



Figura 1.2: Amostra 2 - GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 17 de Maio de 2011 no matadouro Central.



Figura 1.3: Amostra 3 - GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 17 de Maio de 2011 no matadouro Central.



Figura 1.4: Amostra 4 - GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 17 de Maio de 2011 no matadouro Central.



Figura 1.5: Amostra 5 - GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 24 de Maio de 2011 no matadouro Central.



Figura 1.6: Amostra 6 - GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 24 de Maio de 2011 no matadouro Central.



Figura 1.7: Amostra 7 - GL submandibular de suíno de engorda de raça híbrida, proveniente de Espanha, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 24 de Maio de 2011 no matadouro Central.



Figura 1.8: Amostra 8 - GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 24 de Maio de 2011 no matadouro Central.



Figura 1.9: Amostra 9 - GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 22 de Junho de 2011 no matadouro Linda Rosa.



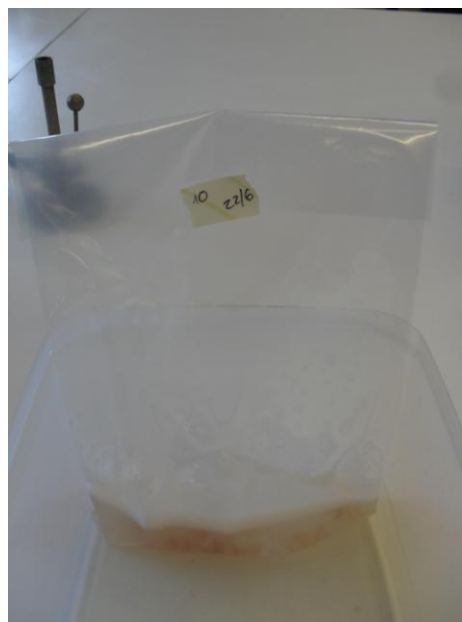
Figura 1.10: Amostra 10 - GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 22 de Junho de 2011 no matadouro Linda Rosa.



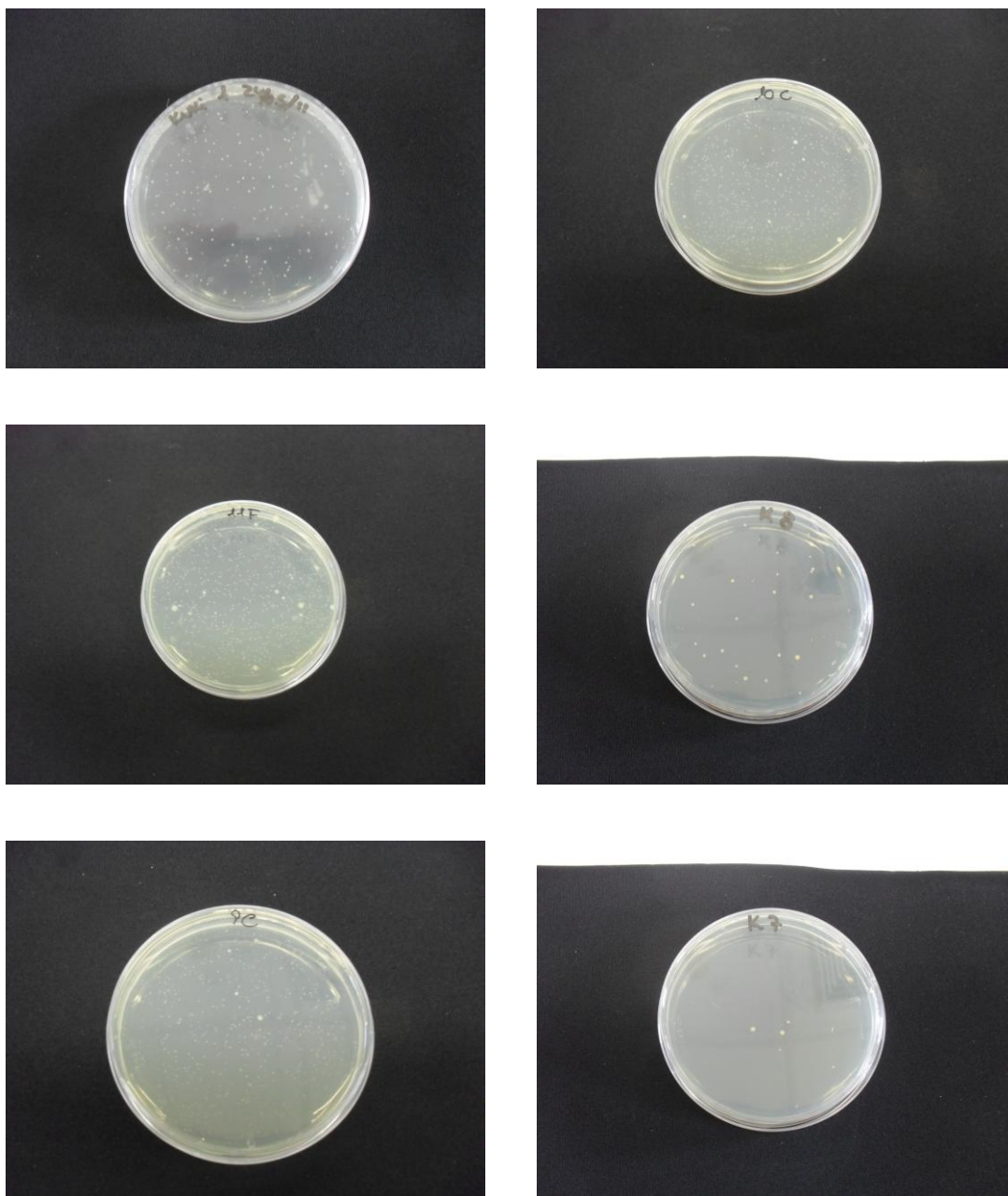
Figura 1.11: Amostra 11 - GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 22 de Junho de 2011 no matadouro Linda Rosa.



Figura 1.12: Amostra 12 - GL submandibular de suíno de engorda de raça cruzada, proveniente de Portugal, aprovado com rejeição parcial (RP) da cabeça, a 22 de Junho de 2011 no matadouro Linda Rosa.



Figuras 2.1 a 2.3: Exemplos das amostras após diluição em solução de Ringer e posterior utilização do *Stomaker* para trituração.

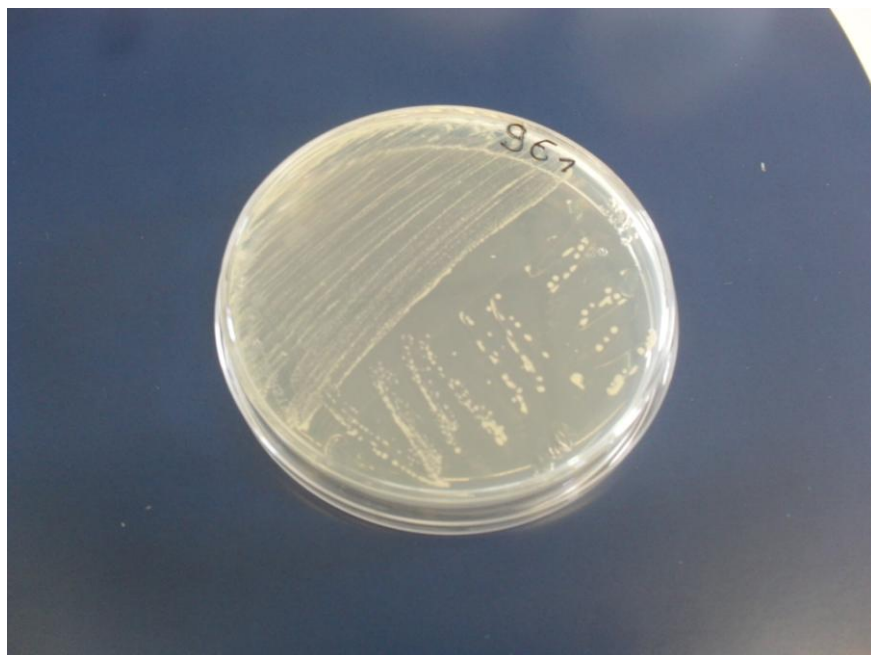
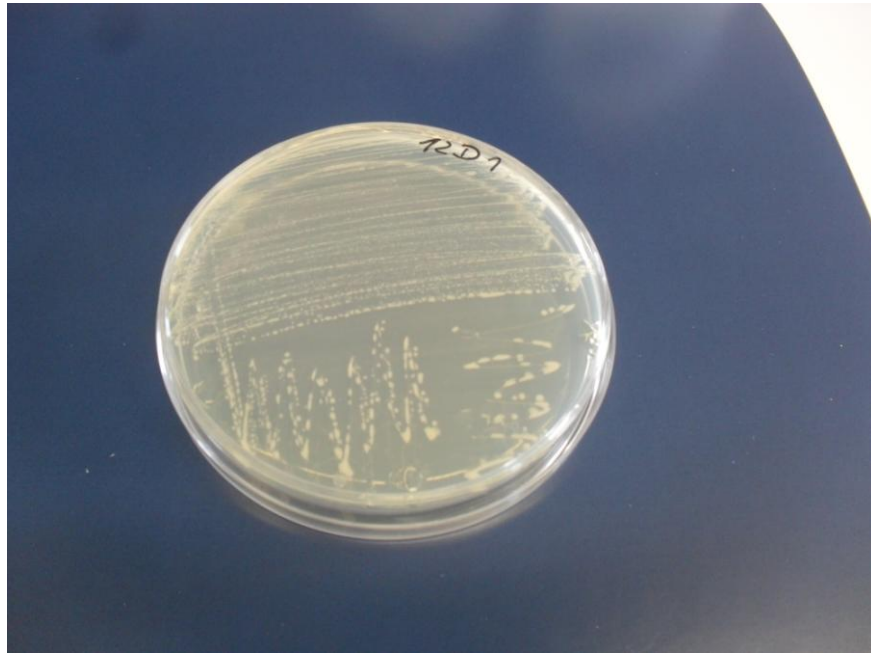


Figuras 3.1 a 3.6: Exemplos das placas obtidas por espalhamento.

2.4. Testes de confirmação das colónias presuntivas de *R. equi*

Sempre que possível, de cada placa de NANAT seleccionaram-se 3 ou 4 colónias características. Para a realização dos testes de confirmação descritos abaixo, as colónias características foram repicadas para meio NAYE e posteriormente incubadas durante 48 horas a 37 °C ou 72 horas a 30 °C (Figuras 4.1 e 4.6). Os isolados foram congelados a -20 °C em duplicado em

ependorfs esterilizados com 300 μ L de meio Tryptic Soy Broth (TSB, Pronadisa) e 20% v/v de glicerol (Panreac, Barcelona. Espanha).



Figuras 4.1 e 4.2: Exemplos de colónias características de *Rhodococcus equi*.

2.5. Execução dos testes bioquímicos

2.5.1. Catalase, oxidase, mobilidade a fresco e coloração de Gram

Como controlos positivos foram usados: *Escherichia coli* para a mobilidade, *Pseudomonas aeruginosa* para o teste da oxidase e *Proteus mirabilis* para o teste da catalase. Para o teste da catalase foi colocada uma gota de peróxido de hidrogénio numa lâmina de microscópio, na qual foi depois dissolvida uma colónia isolada com ansa estéril; uma reacção positiva é obtida pela libertação de oxigénio (Figura 5). O teste da oxidase foi realizado pela diluição do reagente N,N,N',N'-tetrametil-1,4-fenilendiamina (Merck, Damstadt, Alemanha) num tubo de 20 mL de água desionizada, coberto com papel de alumínio; encharcou-se papel de filtro com esta solução e, com a ansa estéril, esfregou-se uma colónia no papel, que tinha sido colhida da placa com a mesma ansa e de forma estéril. Um resultado positivo é obtido por alteração da coloração do papel para azul, na zona em questão (Figura 6). Para o teste da mobilidade a fresco coloca-se uma gota de água desionizada numa lâmina de microscópio e suspende-se uma colónia para observação directa ao microscópio. Finalmente, a coloração de Gram é executada por suspensão de uma colónia numa gota de água desionizada numa lâmina de bisturi, fixando-se à chama; depois esta zona é coberta com cristal violeta (Merck) durante um minuto, passando-se então por água desionizada. Seguidamente, a lâmina é coberta com soluto de lugol (Merck) durante um minuto, lavando-se com álcool (Aga, Prior Velho, Portugal) a 95% e depois água desionizada; por último, cobre-se com safranina (Merck) durante um minuto também, faz-se uma lavagem final com a água desionizada e seca-se cuidadosamente com papel absorvente.

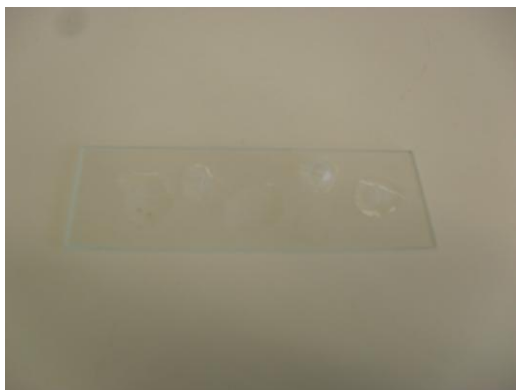


Figura 5: Teste da catalase – exemplo de reacção positiva.

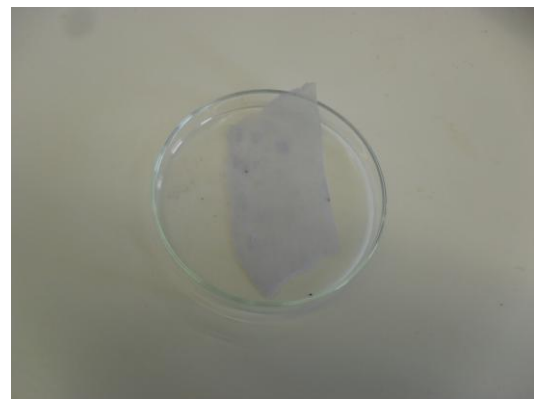


Figura 6: Teste da oxidase - exemplo de reacção positiva

2.5.2. Teste do indole

Para o teste do indole foi utilizada água peptonada (Lab M) esterilizada em tubos de ensaio também esterilizados, nos quais se suspende uma colónia para observação de aparecimento de uma

camada vermelha em forma de anel na parte superior do líquido, após a adição de 0.5 mL do reagente de Kovacs (Merck); o controlo positivo usado foi *E. coli* (Figuras 7.1 e 7.2).



Figura 7.1: Teste da produção de indole (controlo positivo com *E. coli*).



Figura 7.2: Teste da produção de indole (resultado negativo).

2.5.3. Teste da urease

Para o teste da urease preparou-se meio ureia agar (Merck) em frascos Schott de 100 mL aos quais se adicionou por filtração uma solução de ureia (Merck) a 40% (preparada por dissolução de 2 g de ureia em 5 mL de água desionizada); este meio foi colocado em tubos de ensaio esterilizados em rampa e inoculou-se a colónia na superfície. Um resultado positivo é comprovado pela alteração da cor do meio de amarelo alaranjado para rosa choque ou rosa avermelhado; o controlo positivo usado foi *P. mirabilis* (Figuras 8.1 a 8.3).



Figura 8.1: Teste da urease (controlo positivo com *P. mirabilis*).

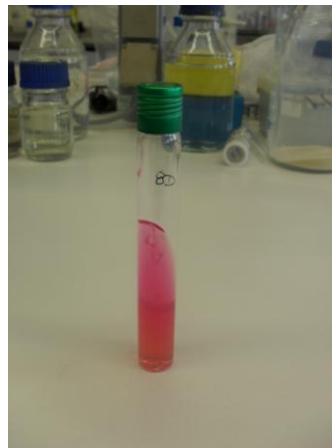


Figura 8.2: Teste da urease (resultado positivo).



Figura 8.3: Teste da urease (resultado negativo).

2.5.4. Teste de redução do nitrato

Para o teste de redução do nitrato foi feito um meio de cultura com os seguintes reagentes: 1.25 g de peptona de carne (Lab M), 0.75 g de extracto de carne (Lab M), 1.25 g de galactose (Acros, New Jersey, EUA), 1.25 mL de glicerol, 0.25 g de nitrato de potássio (Panreac), 0.625 g de hidrogenofosfato dissódio (Merck), 0.75 g de agar (Pronadisa) e 250 mL de água desionizada, acertando-se o pH para 7.3 a 25°C, alcalinizando por adição de uma solução básica de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 1 M (mol/L). Este meio foi colocado em tubos de ensaio esterilizados e as colónias foram inoculadas por picada e incubadas a 37 °C durante 48 horas ou a 30 °C durante 72 horas; como controlo positivo usou-se *P. mirabilis*. Após incubação, adicionou-se 0.3 mL das soluções Nitratos A e Nitratos B. A solução Nitratos A foi preparada pela adição de 0.4 g de ácido sulfanílico (Sigma, Saint Louis, EUA) e de 30 mL de ácido acético glacial (Panreac) a 70 mL de água desionizada; a solução Nitratos B foi preparada por dissolução de 0.6 mL de N,N-dimetil-1-naftilamina (Sigma) e 30 mL de ácido acético glacial a 70 mL de água desionizada. O resultado é considerado positivo quando é observada uma coloração avermelhada após a adição de cada um dos reagentes; se esta não ocorrer imediatamente, adiciona-se um pouco de zinco em pó (Vaz Pereira, Lisboa, Portugal) e se a coloração vermelha se desenvolver, significa que o resultado é negativo. Um resultado positivo neste caso é reportado pela não manifestação de qualquer cor (Figuras 9.1 a 9.3).



Figura 9.1: Teste da redução do nitrato (controlo positivo com *Proteus mirabilis*).

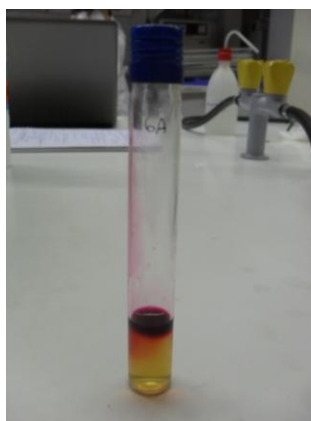


Figura 9.2: Teste da redução do nitrato (resultado positivo).

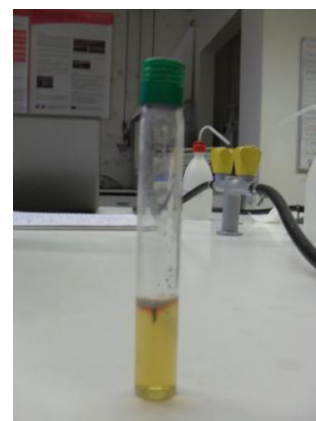


Figura 9.3: Teste da redução do nitrato após adição de zinco em pó (resultado negativo).

2.5.5. Teste da hidrólise da esculina

Para o teste da hidrólise da esculina foi utilizado o meio bile esculine azid agar (Merck); em cada placa foi repicada uma colónia para observação de crescimento, por mudança de cor do meio para negro. O controlo positivo utilizado foi *Enterococcus faecalis* (Figuras 10.1 e 10.2).



Figura 10.1: Teste da hidrólise da esculina (controlo positivo com *E. faecalis*).

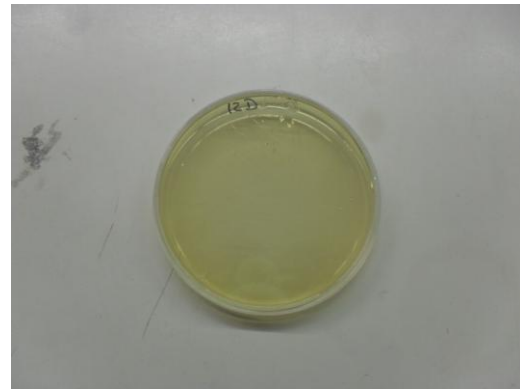


Figura 10.2: Teste da hidrólise da esculina (resultado negativo).

2.5.6. Teste de fermentação dos açúcares

Para os testes de fermentação dos açúcares utilizou-se o meio purple broth (BBL, Sparks, EUA) com 1% pde glicose (Copam, Sintra, Portugal), sacarose (Panreac) e maltose (Merck). As culturas foram repicadas para observação de crescimento; um resultado positivo é comprovado por mudança de cor do meio de roxo/lilás para amarelo. O controlo positivo utilizado para os três açúcares foi *Lactobacillus acidophilus* (Figuras 11.1 a 11.4).

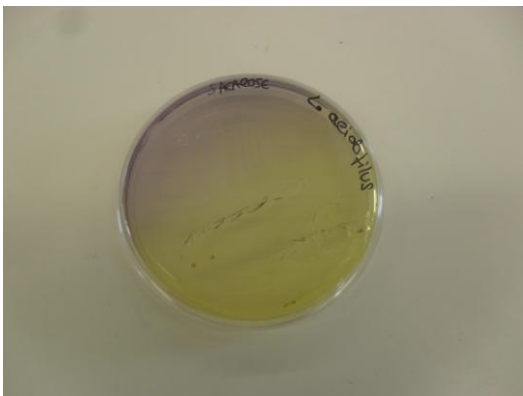


Figura 11.1: Exemplo de controlo positivo do teste de fermentação de açúcares (sacarose), com *L. acidophilus*.

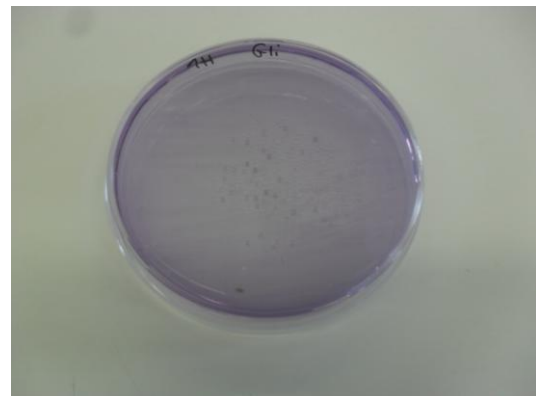


Figura 11.2: Resultado negativo no teste de fermentação da glicose.

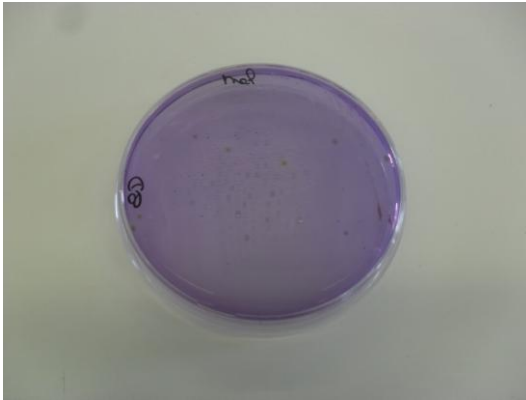


Figura 11.3: Resultado negativo no teste de fermentação da maltose.



Figura 11.4: Resultado negativo no teste de fermentação da sacarose.

2.5.7. Teste de CAMP

O teste de CAMP foi efectuado em placas de gelose sangue (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, França) em reacção sinérgica com *Staphylococcus aureus*; para controlo positivo, utilizou-se *Listeria monocytogenes* (Figura 12).

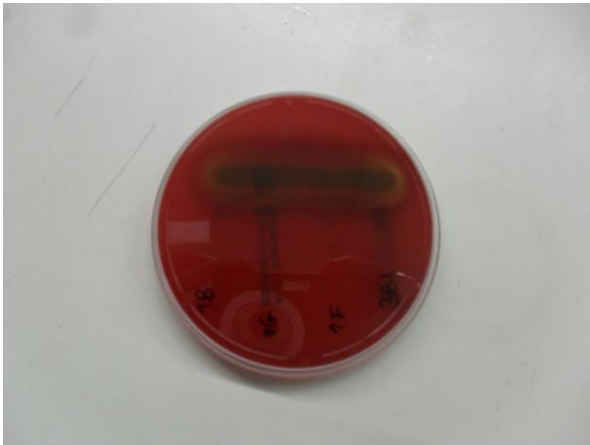


Figura 12: Teste de CAMP.

Para todos estes testes supracitados, o crescimento foi em estufa a 37 °C durante 48 horas ou a 30 °C durante 72 horas.

3. Resultados

A identificação de *R. equi* teve por base as características apresentadas na tabela 1 na secção da introdução. De acordo com estas características foram identificadas como positivas para *R. equi* as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11 e 12, e excluídas apenas as amostras 7 e 9. Segue-se a explicação detalhada dos resultados obtidos, seguidamente sumarizados em tabela.

Considerando primeiramente as 4 amostras (1 a 4) recolhidas 17 de Maio de 2011, apenas uma das placas inoculadas com a amostra 4 resultou catalase negativa (primeiro teste a ser efectuado devido à sua maior simplicidade e menor custo); as restantes placas desta amostra 4 apresentaram um resultado positivo, assim como todas as placas das restantes amostras (1, 2 e 3), compativelmente com a característica de *R. equi*. Obviamente, já não foi feito o teste da oxidase com colónias desta placa em particular da amostra 4 (catalase negativa), e todas as outras placas desta amostra, bem como todas as placas das amostras 1, 2, e 3, obtiveram resultado negativo (incolor). Posteriormente foi então realizado o teste da mobilidade a fresco com todos os resultados também negativos e prosseguiu-se então para a coloração de Gram: as amostras 1 e 2 tiveram três resultados Gram negativos, a amostra 3 teve apenas um e a amostra 4 já não obteve nenhum Gram negativo. Ou seja, três placas das amostras 1 e 2, cinco placas da amostra 3 e as restantes 5 placas da amostra 4 foram classificadas como cocobacilos Gram positivos. Em seguida, todas estas amostras Gram positivas foram negativas para a hidrólise da esculina, indole, mobilidade (em meio sólido) e fermentação dos açúcares; já no teste de CAMP só houve resultados positivos. No teste de redução do nitrato, houve apenas um resultado negativo entre as três placas das amostras 1 e 2; no teste da urease adquiriu-se mais um resultado negativo das três placas da amostra 1 (o mesmo que foi negativo para a redução do nitrato) e das cinco placas da amostra 3. Desta forma, no final obtiveram-se duas placas das amostras 1 e 2, quatro da amostra 3 e cinco da amostra 4. Estes exemplares compatíveis com *R. equi* foram novamente congelados em *eppendorfs*.

Seguidamente passou-se ao abate de dia 24 de Maio de 2011, no qual foram reunidas as amostras 5 a 8; todas as placas inoculadas em meio NAYE tiveram resultado positivo para o teste da catalase, obtendo-se depois três resultados positivos no teste da oxidase (um da amostra 5 e dois da amostra 7). No teste da mobilidade a fresco das restantes cinco placas da amostra 5, quatro placas da amostra 7 e todas as seis placas das amostras 6 e 8, todos os microrganismos se encontravam imóveis. Relativamente à coloração de Gram houve um resultado Gram negativo numa das placas das amostras 5 e 6, restando então quatro placas da amostra 5 e cinco placas da amostra 6 para seguimento do estudo. A amostra 7 foi desacreditada do estudo, pois todas as lâminas executadas com cada uma das restantes quatro placas eram Gram negativas; já para a amostra 8, todos os resultados das seis placas iniciais foram cocobacilos Gram positivos. Posteriormente, todas estas amostras Gram positivas foram negativas para a hidrólise da esculina, indole, mobilidade (em meio sólido) e fermentação dos açúcares; no teste de CAMP só houve resultados positivos. Já para a redução do nitrato, houve um resultado negativo entre as seis placas totais da amostra 8; por último, no teste da urease, adquiriu-se mais um resultado negativo da mesma amostra 8, o mesmo que se

revelou negativo para a redução do nitrato, sobrando então cinco placas desta amostra 8. Desta forma, no final sobejaram quatro placas da amostra 5 e cinco das amostras 6 e 8. Estes exemplares compatíveis com *R. equi* foram novamente congelados em *eppendorfs*.

Por fim, chegou-se ao abate do dia 22 de Junho de 2011, onde se angariaram as amostras 9 a 12. Houve apenas um resultado negativo para o teste da catalase das seis placas da amostra 9 e no da oxidase obtiveram-se três resultados positivos – um entre as cinco restantes placas da amostra 9 e um entre as seis placas iniciais das amostras 10 e 11. No teste da mobilidade a fresco, todos os microrganismos das restantes placas utilizadas revelaram imobilidade. Quanto à coloração de Gram, todas as lâminas das quatro placas restantes da amostra 9 se apresentaram como Gram negativas; assim, esta amostra foi também desqualificada da investigação, como já tinha acontecido para a amostra 7 do lote anterior. Para as amostras 10 e 11, todas as lâminas das restantes cinco placas obtiveram bons resultados (cocobacilos Gram positivos); finalmente, para a amostra 12 houve apenas dois resultados não compatíveis (Gram negativos), restando então quatro placas desta amostra para continuação em análise. Seguidamente, todas estas amostras Gram positivas utilizadas foram negativas para a hidrólise da esculina, indole, mobilidade (em meio sólido) e fermentação dos açúcares; no teste de CAMP e da redução do nitrato só houve resultados positivos, compatíveis com *R. equi*. Por fim, no teste da urease alcançou-se um resultado negativo da amostra 11 (da qual restaram então quatro placas) e outro da amostra 12 (da qual restaram três placas). Assim sendo, no final dos testes bioquímicos para este lote de amostras retiveram-se cinco placas da amostra 10, quatro da amostra 11 e três da amostra 12. Os exemplares compatíveis com *R. equi* foram novamente congelados em *eppendorfs*.

Estes resultados explicados no texto acima estão explicitados mais sucinta e simplesmente na tabela 3 que se segue.

Tabela 3: Características bioquímicas dos isolados identificados presuntivamente como *R. equi*.

Teste	Amostra											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilidade a fresco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coloração de Gram	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-		-		-	-	-
Hidrólise da esculina	-	-	-	-	-	-		-		-	-	-
Fermentação carboidratos	-	-	-	-	-	-		-		-	-	-

Tabela 3: Características bioquímicas dos isolados identificados presuntivamente como *R. equi*.

Teste	Amostra											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
cAMP	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
Mobilidade meio sólido	-	-	-	-	-	-		-		-	-	-
Redução do nitrato	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
Compatível com <i>R. equi</i>	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim	não	sim	sim	sim

Legenda: + (positivo); - (negativo); sombreado a cinzento (ensaios não realizados visto os testes anteriores demonstrarem incompatibilidade com *R. equi*).

4. Discussão

Este estudo demonstrou que existe a probabilidade das lesões granulomatosas encontradas em GL submandibulares de suínos poderem não ser devidas a *Mycobacterium* spp., mas sim a *R. equi*, uma vez que esta bactéria foi isolada de GL com lesões macroscopicamente atribuídas a *Mycobacterium* spp. (Woolcock *et al.*, 1979; Lechevalier, 1986 e Takai *et al.*, 1996). Não foi possível realizar o isolamento de *Mycobacterium* spp. pois a ESB não possui laboratórios com as condições de segurança necessárias para se trabalhar com estes microrganismos. Não foi realizada a coloração ZN para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes pois a bactéria *R. equi* também seria positiva para esta coloração, não sendo então ideal para fazer a distinção.

Apesar de não terem entrado neste estudo GL mesentéricos, poder-se-á extrapolar os resultados para estes, pois apenas não foram colhidos estes GL devido à maior facilidade aquando da IS da secção dos GL submandibulares, pois além dos mesentéricos serem bastante mais difíceis de identificar, a linha de abate é demasiado rápida para que se consiga examinar todos os GL minuciosamente. No caso de serem encontradas lesões granulomatosas nos GL submandibulares, são seccionados também os mesentéricos para exame de possíveis lesões; neste estudo, não foram encontradas lesões nos GL mesentéricos dos mesmos suínos com lesões nos submandibulares. Ademais, o próprio isolamento de *R. equi* acontece quase exclusivamente em GL submandibulares (tracto respiratório em detrimento do gastrointestinal), como referido por Komijn *et al.* (2007) e por Ribeiro *et al.* (2011).

Este estudo foi incluído no trabalho laboratorial para obtenção do grau de mestre em Inovação Alimentar; este mestrado da ESB da UCP encontra-se inserido na parte final da Pós-graduação (PG) em Segurança Alimentar, como continuação da mesma. Devido ao curto espaço de tempo em que este estudo foi desenvolvido, foram apenas usados GL com lesões macroscópicas; não se realizou a tentativa de isolamento de *R. equi* em GL saudáveis como já foi também descrito por Makrai *et al.* (2005), Taylor (2006) e Komijn *et al.* (2007).

Duas das amostras (como descrito na secção anterior Resultados – amostras 7 e 9) foram bacteriologicamente negativas para *R. equi* (Komijn *et al.*, 1999 e 2007). Estas amostras apresentavam bactérias Gram negativo, o que não está de acordo com as características de *R. equi*. A possibilidade das bactérias isoladas pertencerem ao género *Mycobacterium* foi excluída pois as micobactérias não coram com a coloração de Gram e, como já mencionado, possuem um crescimento muito lento e as placas de ambas as amostras 7 e 9 já se encontravam repletas de colónias às 48 horas de crescimento em estufa a 37 °C. Também a probabilidade de *Mycobacterium* spp. crescer num meio não selectivo para ele é bastante reduzida. As explicações oferecidas pelo autor citado foram que essas lesões granulomatosas encontradas poderiam ser meramente estéticas ou que o processo patológico teria terminado e sido atingida a cura, não havendo bactérias viáveis presentes. Foi ainda sugerido que, durante a resposta imune do organismo hospedeiro à infecção, a formação que daí se origina resulta numa completa desvitalização do agente bacteriológico. Assim, podemos facilmente concluir que a detecção de lesões granulomatosas em GL de suínos apenas por

observação macroscópica não é de todo fiável como teste diagnóstico para determinação de infecção por *Mycobacterium* spp. (sobretudo MAA), sendo portanto necessárias culturas para determinação da verdadeira prevalência desta bactéria em suínos, pois estas são ainda o teste mais garantido que possuímos (Komijn *et al.*, 1999; Shitaye *et al.*, 2006). Porém, este método apresenta óbvias desvantagens, pois é complexo, moroso e dispendioso. Desta forma, é essencial o desenvolvimento de novos testes mais rápidos e confiáveis para a detecção da TB suína, como por exemplo o teste de IHQ, como documentado por Morés *et al.* (2007). Isto torna-se importante pois, ao contrário dos integrantes do MAC, *R. equi* não foi detectado nos órgãos parenquimatosos, parecendo limitar-se ao intestino e GL adjacentes, assim como aos GL da cabeça como local de predilecção, como supracitado (Shitaye *et al.*, 2006; Komijn *et al.*, 2007 e Ribeiro *et al.*, 2011).

Em 2004, Komijn e seus colaboradores (2007) notaram o aumento da prevalência de lesões granulomatosas nos GL de suínos na Holanda, não tendo sido porém detectadas bactérias do MAC. Assim, segundo Pavlik *et al.* (2005), Shitaye *et al.* (2006) e Morés *et al.* (2007), as causas da formação de granulomas poderão ser outras espécies bacterianas como *Rhodococcus equi*. Também isto é mencionado por Eisenberg *et al.* (2012). Embora Pavlik e seus colaboradores (2003) tenham isolado *R. equi* em somente 8.8% de animais e em mais 2.8% quando associado a micobactérias (sobretudo em GL da cabeça), no estudo holandês já supracitado *R. equi* foi isolado de 44.9% dos GL submaxilares com lesões granulomatosas e ainda de dois GL mesentéricos sem lesões (Komijn *et al.*, 2007); isto indica que a prevalência de infecções por MAA em suínos tem decrescido enquanto *R. equi* tem sido bastante predominante. Num estudo brasileiro realizado por Lara e seus colaboradores (2011), em casos de linfadenites suínas as bactérias pertencentes ao género *Mycobacterium* foram isoladas em 24.1% dos GL e *R. equi* em 13.2% dos mesmos, sendo estes os microrganismos mais prevalentes; em GL sem lesões foram identificados diversos microrganismos, incluindo micobactérias ambientais. Em javalis selvagens com a mesma patologia, *Mycobacterium* spp. estava presente em 8.4% dos GL e *R. equi* em 6.6%, também os microrganismos mais comumente isolados, em concordância com o estudo anterior. Também na República Checa *R. equi* foi isolado de 8.8% dos animais e em 2.8% em combinação com micobactérias (Pavlik *et al.*, 2005). A elevada incidência de lesões granulomatosas associadas à presença de *R. equi* pode ser considerada como uma causa de diagnóstico errado de infecções por MAA em casos em que a inspecção sanitária é executada apenas com base na observação macroscópica de alterações granulomatosas nos GL.

5. Conclusão

Na IS, um exame macroscópico detalhado e sistemático permite a obtenção do diagnóstico e a aplicação da DS adequada na grande maioria dos casos. Todavia, existem lesões em que o apoio laboratorial se torna indispensável. Na linfadenite granulomatosa suína, o exame histológico pode ser uma preciosa ferramenta proporcionando o diagnóstico de TB ganglionar, mas existe a forte possibilidade de ocorrência de resultados falsos-positivos devido à existência de outros microrganismos que apresentam alguma álcool-ácido resistência, induzindo lesões semelhantes quando se realiza a coloração de ZN, como por exemplo *R. equi*. Nestas situações, é crucial o recurso a exames bacteriológicos mais detalhados para uma identificação correcta dos agentes etiológicos envolvidos e aplicação conforme da DS, de forma a não pôr em risco a segurança alimentar e a saúde pública, mas também a não prejudicar o produtor ou, pelo menos, evitar grandes perdas económicas da sua parte, limitando-as às mínimas possíveis. Porém, a autoridade veterinária nacional considera de forma errónea que as lesões de linfadenite granulomatosa suína se devem exclusivamente a bactérias do género *Mycobacterium*, sendo o Inspector Sanitário deste modo obrigado a agir de acordo com o estabelecido, visto nestes casos não serem disponibilizados meios para pesquisas adicionais, quando na realidade estas lesões podem ter outra origem, como já foi comprovado por vários estudos citados na introdução e mesmo como ficou patente com a realização desta sucinta análise laboratorial.

Tendo em conta os resultados obtidos nesta investigação, este estudo demonstrou que existe a probabilidade das lesões granulomatosas encontradas em GL submandibulares de suínos poderem não ser devidas a *Mycobacterium* spp., mas sim a *R. equi*, uma vez que esta bactéria foi isolada de GL com lesões macroscopicamente atribuídas a *Mycobacterium* spp. (Woolcock *et al.*, 1979; Lechevalier, 1986 e Takai *et al.*, 1996). Duas das 12 amostras (números 7 e 9) foram bacteriologicamente negativas para *R. equi*, como comprovado pelos testes bioquímicos mencionados acima, já que revelaram resultado negativo na coloração de Gram, mas a maioria dos resultados foram compatíveis com *R. equi*, ou seja, 10 das 12 amostras, obtendo-se então uma percentagem aproximada de 83.3%. Ainda assim, considerando a dimensão extremamente reduzida da amostra, não pode ser considerada uma percentagem significativa que possa ser referida com convicção, mas resulta já numa simples e moderada introdução básica para estudos posteriores e investigações futuras a realizar em território português.

Uma vez que a TB é uma patologia considerada DDO, podem estar a notificar-se explorações como portadoras de TB que na realidade podem não o ser. Assim, urge a necessidade de investigações adicionais a nível nacional sobre os agentes causativos destas lesões observadas em matadouro para que possa ser tomada a DS apropriada e para que se notifiquem correctamente as explorações de suínos portadoras de TB, de forma a não causar perdas económicas para os produtores e donos de explorações superiores às desejadas e necessárias.

A realização do estágio curricular aquando do final da licenciatura em Medicina Veterinária permitiu-me tomar conhecimento das actividades da responsabilidade do MVO, bem como todas as funções que desempenha e a convivência com os autênticos obstáculos que enfrenta no quotidiano. Amiúde, a tarefa do MVO é dificultada por obscuridade ou carência da legislação actual que muitas vezes não considera certas situações, assim como por ausência de resposta laboratorial imediata, tensão e pressão exercida sobretudo pelos proprietários dos estabelecimentos funcionais e ainda o número diminuto de Inspectores Sanitários e Auxiliares de IS disponíveis. Ademais, o MVO tem ainda a seu cargo a educação de todos os funcionários que integram o circuito de abate, o que nem sempre é pacífico ou acessível. No Reg. (CE) n.º 854/2004 de 29 de Abril utilizado no dia-a-dia dos Inspectores Sanitários, não se encontram assentes os critérios específicos de DS em caso de lesões provocadas por *R. equi* em suínos. Ademais, como já referido acima, a autoridade veterinária nacional considera que as lesões de linfadenite granulomatosa suína se devem na grande maioria dos casos aos agentes causativos pertencentes a MAC e só muito raramente a *M. bovis* e *M. tuberculosis*, não sendo regularmente efectuados os exames laboratoriais necessários para a confirmação desta suspeita. Todavia, segundo Wilson (2005), perante lesões compatíveis com linfadenite granulomatosa por *R. equi*, a DS a aplicar consiste apenas na remoção dos GL afectados.

Os actos de IS são essenciais em termos de Saúde Pública e Segurança Alimentar, pois previnem a inclusão de produtos de origem animal impróprios para consumo humano na cadeia alimentar. Os exames *ante-mortem* e *post-mortem* macroscópicos pormenorizados e metódicos geralmente permitem chegar ao diagnóstico e assim aplicar a DS apropriada; no entanto, existem outras lesões em que o auxílio laboratorial é imperativo, mas este é usualmente demorado. A questão da linfadenite granulomatosa suína seria uma das patologias para as quais seria essencial outro método de diagnóstico rápido que não a visualização macroscópica somente. Para o exercício apropriado e responsável desta profissão é necessário um elevado conhecimento de diversas áreas como Anatomia, Patologia, Parasitologia ou Microbiologia, entre outras, sendo ainda fundamental a sua inter-relação adequada.

No caso específico da linfadenite granulomatosa suína, este apoio laboratorial seria então crucial, mas a maioria das vezes é inexistente, pois os MVO optam mais frequentemente pela não realização de exames mais detalhados quer pela morosidade dos mesmos quer pela já referida pressão psicológica exercida por muitos proprietários dos estabelecimentos de abate, pois isso implicaria que a(s) carcaça(s) se mantivesse(m) em observação durante o período do teste, que pode ser bastante elevado, uma vez que o principal ensaio para provar ou descartar a presença de micobactérias é ainda a cultura microbiológica, com a agravante de que estes são microrganismos de crescimento lento. Desta forma, é essencial o desenvolvimento de novos testes mais rápidos e confiáveis para a detecção da TB suína, como o aperfeiçoamento da IHQ como teste rápido a utilizar em estabelecimentos de abate para comodidade dos MVO.

6. Trabalho futuro

Para continuação deste estudo, penso que a amostra deveria ser bastante aumentada, já que neste caso foi de diminuta dimensão por falta de tempo de estudo; além disto, dever-se-á alargar a região dos matadouros onde se realizam as colheitas, além de estudar diferentes épocas do ano, pois, como descrito na introdução, os meses de Verão são os mais críticos.

Como proposta de trabalho futuro, e uma vez que as amostras compatíveis com *R. equi* nos testes bioquímicos efectuados se encontram congeladas em *ependorfs*, há a possibilidade de realizar a extracção e sequenciação de DNA para assim podermos ter garantia de se tratar ou não da bactéria suspeita, por determinação da ordem das bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina e timina que compõem a molécula de DNA.

Com o intuito de incrementar os planos específicos de fiscalização penso que urge o esboço de um grupo de investigações de forma a considerar a estimativa das perdas económicas concebidas pela doença, os factores de risco, as fontes e os métodos de transmissão das micobacterioses e ainda de *R. equi*. Outro passo relevante seria a averiguação do suíno como causa de infecção na disseminação entre explorações devido à comercialização e venda dos suínos reprodutores. Como esta comercialização acontece, usualmente, com suínos de 5 a 6 meses, se a exploração de origem estiver contaminada com *Mycobacterium* spp. existe elevada probabilidade desses animais se encontrarem infectados e difundirem a patologia na vara receptora, já que o período de excreção activa da bactéria nas fezes é ainda bastante prolongado. Considerando tudo isto, é recomendável que se tome a precaução de inserir apenas animais provenientes de explorações onde a doença nunca tenha sido reportada quando se trata de explorações destinatárias com essa mesma condição sanitária. Se estas informações não estiverem disponíveis, uma hipótese é a execução de quarentena dos novos animais, testando-os com a prova ID referida na Introdução.

Todavia, se a doença já tiver sido documentada em determinada exploração, deverá ser promovido uma rigorosa estratégia de controlo baseada em medidas sanitárias e higiénicas com a finalidade de diminuir a sua difusão entre os diversos animais.

Poderão ainda ser efectuados outros tipos de investigações como estudos de caso-controlo (associação de factores de risco a práticas inadequadas de higiene, por exemplo), estudo da sazonalidade (para determinação de picos de ocorrência) ou análise dos resultados após controlo dos factores de risco já identificados, sendo as explorações visitadas periodicamente a intervalos regulares durante algum tempo para monitorização da adopção das medidas de controlo sugeridas e também registados os dados de abate e percentagens de rejeição por linfadenite durante o mesmo período.

Além disto, são necessários mais estudos epidemiológicos que revelem os aspectos moleculares em casos de infecção por *R. equi*.

7. Bibliografia

Durnez L, Eddyani M, Mgode GF, Katakweba A, Katholi CR, Machang'u RR, Kazwala RR, Portaels F, Leirs H. 2008. First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**: 768-773.

Eisenberg T, Volmer R, Eskens U, Moser I, Nesseler A, Sauerwald C, Seeger H, Klewer-Fromentin K, Möbius P. 2012. Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*. *Veterinary Microbiology*. In Press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.013>.

Fosse J, Seegers H, Magras C. 2008. Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. *Veterinary Research*. **39**: 1-16.

Gabriels P, Joosen H, Put E, Verhaegen J, Magerman K, Cartuyels R. 2006. Recurrent *Rhodococcus equi* infection with fatal outcome in an immunocompetent patient. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **25**: 46-48.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pp. 151, 179-180, 184-185, 528, 566, 570, 597-603.

Komijn RE, Haas PEW, Schneider MME, Eger T, Nieuwenhuijs JHM, Hoek, RJ, Bakker D, Erveld FGZ, Soolingen D. 1999. Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 1254-1259.

Komijn RE, Wisselink HJ, Rijsman VMC, Stockhofe-Zurwieden N, Bakker D, Zijderveld FG, Eger T, Wagenaar JA, Putirulan F, Urlings BAP. 2007. Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*. **120**: 352-357.

Kozak A, Vecerek V, Chloupek P, Tremlova B, Malena M. 2003. Veterinary meat inspection of pig carcasses in the Czech Republic during the period of 1995-2002. *Veterinární Medicína*. **48**: 207-213.

Lara GHB, Ribeiro MG, Leite CQF, Paes AC, Guazzelli A, Silva AV, Santos ACB, Listoni FJP. 2011. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). *Research in Veterinary Science*. **90**: 185-188.

Lechevalier, HA. 1986. Section 26 Nocardioform Actinomycetes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4 (Williams ST, Sharpe ME, Holt JG), Williams & Wilkins, Baltimore. Pp. 2362-2371.

Makrai L, Kobayashi A, Matsuoka M, Sasaki Y, Kakuda T, Dénes B, Hajtós I, Révész I, Jánosi K, Fodor L, Varga J, Takai S. 2008. Isolation and characterization of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). *Veterinary Microbiology*. **131**: 318-323.

Makrai L, Takai S, Tamura M, Tsukamoto A, Sekimoto R, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Varga J, Fodor L, Solymosi N, Major A. 2002. Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Veterinary Microbiology*. **88**: 377-384.

Makrai L, Takayama S, Dénes B, Hajtós I, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Major A, Fodor L, Varga J, Takai S. 2005. Characterization of virulence plasmids and serotyping of *Rhodococcus equi* isolates from submaxillary lymph nodes of pigs in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 1246-1250.

Margolis MJ, Hutchinson LJ, Kephart KB, Hattel AL, Whitloch RH, Payeur JB. 1994. Results of using histologic examination and acid-fast staining to confirm a diagnosis of swine mycobacteriosis made on the basis of gross examination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **204**: 1571-1572.

Matlova L, Dvorska L, Bartil J, Bartos M, Ayele WY, Alexa M, Pavlik I. 2003. Mycobacteria isolated from the environment of pig farms in the Czech Republic during the years 1996 to 2002. *Veterinární Medicína*. **48**: 343-357.

Matlova L, Dvorska L, Bartos M, Docekal J, Trckova M, Pavlik I. 2004. Tuberculous lesions in pig lymph nodes caused by kaolin fed as a supplement. *Veterinární Medicína*. **49**: 379-388.

Matlova L, Dvorska L, Palecek K, Maurenc L, Bartos M, Pavlik I. 2004. Impact of sawdust and wood shavings in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of serotypes 6 and 8 isolated from pigs and environment. *Veterinary Microbiology*. **102**: 227-236.

- Meijer WG, Prescott JF. 2004. *Rhodococcus equi*. *Veterinary Research*. **35**: 383-396.
- Miltner EC, Bermudez LE. 2000. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**: 1990-1994.
- Möbius P, Lentzsch P, Moser I, Naumann L, Martin G, Köhler H. 2006. Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Veterinary Microbiology*. **117**: 284-291.
- Moravkova M, Bartos M, Dvorska-Bartosova L, Beran V, Parmova I, Ocepek M, Pate M, Pavlik I. 2007. Genetic variability of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* of pig isolates. *Veterinární Medicína*. **52**: 430-436.
- Morés N, Silva VS. 2001. Micobacterioses dos suínos – linfadenite tuberculóide. Embrapa Suínos e Aves, São Paulo (Brasil), 8 páginas (55-62).
- Morés N, Ventura L, Dutra V, Silva VS, Barioni Jr W, Oliveira SR, Kramer B, Neto JSF. 2007. Linfadenite granulomatosa em suínos: linfonodos afetados e diagnóstico patológico da infecção causada por agentes do Complexo *Mycobacterium avium*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. **27**: 13-17.
- Nishiuchi Y, Maekura R, Kitada S, Tamaru A, Taguri T, Kira Y, Hiraga T, Hirotsu A, Yoshimura K, Miki M, Ito M. 2007. The recovery of *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex (MAC) from residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clinical Infectious Diseases*. **45**: 347-351.
- Norton CD, LeChevallier MW. 2000. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 268-276.
- Oliveira, EMD. 2005. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium* em suínos [Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal dissertação]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: São Paulo. 85 pp. Disponível: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Pakarinen J, Nieminen T, Tirkkonen T, Tsitko I, Ali-Vehmas T, Neubauer P, Salkinoja-Salonen MS. 2007. Proliferation of mycobacteria in a piggery environment revealed by *mycobacterium*-specific real-time quantitative PCR and 16S rRNA sandwich hybridization. *Veterinary Microbiology*. **120**: 105-112.

Pate M, Pirs T, Zdovc I, Krt B, Ocepek M. 2004. Haemolytic *Rhodococcus equi* isolated from a swine lymph node with granulomatous lesions. *Journal of Veterinary Medicine*. **51**: 249-250.

Pate M, Zdovc I, Pirs T, Krt B, Ocepek M. 2004. Isolation and characterization of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of swine lymph nodes in Slovenia. *Acta Veterinaria Hungarica*. **52**: 143-150.

Pate M, Zolnir-Dovc M, Krt B, Ocepek M. 2008. IS 1245 RFLP-based genotyping study of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from pigs and humans. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. **31**: 537-550.

Pavlik I, Matlova L, Dvorska L, Bartl J, Oktabcova L, Docekal J, Parmova I. 2003. Tuberculous lesions in pigs in the Czech republic during 1990-1999: occurrence, causal factors and economic losses. *Veterinární Medicína*. **48**: 113-125.

Pavlik I, Matlova L, Dvorska L, Shitaye JE, Parmova I. 2005. Mycobacterial infections in cattle and pigs caused by *Mycobacterium avium* complex members and atypical mycobacteria in the Czech republic during 2000-2004. *Veterinární Medicína*. **50**: 281-290.

Poolkhet C, Chumsing S, Wajjwalku W, Minato C, Otsu Y, Takai S. 2010. Plasmid profiles and prevalence of intermediately virulent *Rhodococcus equi* from pigs in Nakhonpathom province, Thailand: identification of a new variant of the 70-kb virulence plasmid, type 18. *Veterinary Medicine International*. **2010**: 1-5.

Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. **17**: 98-106.

Reed GB. 1986. Section 16 The Mycobacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2* (Williams ST, Sharpe ME, Holt JG), Williams & Wilkins, Baltimore. Pp. 1435-1457.

Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, "que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios". *Jornal Oficial da União Europeia* 31 de 01.02.2002.

Regulamento (CE) n.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, “que estabelece as regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano”. *Jornal Oficial da União Europeia* 139/206 de 30.04.2004.

Resende COM, Teixeira JR, Martins NA, Santos NB, Teixeira PA, Ávila DF. 2008. Estudo do *Mycobacterium avium* do complexo MAIS na suinocultura. 35º conbravet – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária.

Ribeiro MG, Takai S, Guazzelli A, Lara GHB, Silva AV, Fernandes MC, Condas LAZ, Siqueira AK, Salerno T. 2011. Virulence genes and plasmid profiles in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. *Research in Veterinary Science*. **91**: 478-481.

Rizwan M, Sharma YK, Venkitasubramanian TA. 1985. Metabolism of mycobacteria. *Journal of Biosciences*. **7**: 421-431.

Shitaye JE, Parmova I, Matlova L, Dvorska L, Horvathova A, Vrbas V, Pavlik I. 2006. Mycobacterial and *Rhodococcus equi* infections in pigs in the Czech Republic between the years 1996 and 2004: the causal factors and distribution of infections in the tissues. *Veterinární Medicína*. **51**: 497-511.

Silva VS, Morés N, Dutra V, Neto JF. 2000. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **52**: 562-566.

Stepanova H, Pavlova B, Stromerova N, Matiasovic J, Kaevska M, Pavlik I, Faldyna M. 2011. Cell-mediated immune response in swine infected with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **142**: 107-112.

Suehiro, RT. 2008. Avaliação da virulência de isolados suínos de *Mycobacterium avium* no Brasil caracterizados pelo método de RFLP [Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal dissertação]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: São Paulo. 59 pp. Disponível: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Takai S, Fukunaga N, Ochiai S, Imai Y, Sasaki Y, Tsubaki S, Sekizaki T. 1996. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 1034-1037.

Taylor DJ. 2006. Miscellaneous Bacterial Infections. In: Diseases of the Swine (Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S & Taylor DJ), Wiley-Blackwell, Iowa. Pp. 638-639.

Thoen CO. 2006. Tuberculosis. In: Diseases of the Swine (Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S & Taylor DJ), Wiley-Blackwell, Iowa. Pp. 807-813.

Tirkkonen T, Pakari J, Moisander AM, Mäkinen J, Soini H, Ali-Vehmas T. 2007. High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative IS1245 RFLP analysis. *Veterinary Microbiology*. **125**: 175-181.

Wayne LG, Kubica GP. 1986. Section 16 the Mycobacteria. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Williams ST, Sharpe ME, Holt JG), Williams & Wilkins, Baltimore. Pp. 1435-1457.

Wilson WG. 2005. Affections of specific parts and tumours. In: Wilson's Practical Meat Inspection (Wilson WG), Blackwell Publishing, Hong Kong. Pp. 187-188.

Woolcock JB, Farmer AT, Mutimer MD. 1979. Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. *Journal of Clinical Microbiology*. **9**: 640-652.