

EUGENIA MÁRCIA DE DEUS OLIVEIRA

**Estudo da transmissão horizontal de
Mycobacterium avium em suínos**

São Paulo
2005

EUGENIA MÁRCIA DE DEUS OLIVEIRA

**Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium*
em suínos**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo
2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T. 1455 Oliveira, Eugenia Márcia de Deus
FMVZ Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium* em
 suínos / Eugenia Márcia de Deus Oliveira. – São Paulo : E. M. D.
 Oliveira, 2005.
 85 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada
às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Suínos. 2. Linfadenite granulomatosa. 3. Complexo
Mycobacterium avium. 4. Transmissão horizontal. I. Título.



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

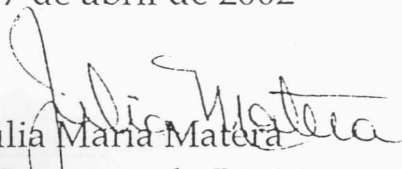
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium* em suínos.", Protocolo nº 90/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 17/04/2002.

(We certify that the Research "Study of the horizontal transmission of swine micobacteriosis" protocol number 90/2002, under the responsibility of Prof.Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 04/17/2002 meeting.

São Paulo, 17 de abril de 2002


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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Eugenia Márcia de Deus

Título: Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium* em suínos

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

Data: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico

À minha mãe Analha de Deus Oliveira (“in memoriam”). Ausente na matéria, mas presente no espírito.

Quando a saudade serve de fios invisíveis por onde corre o amor puro de pessoas que se amam e se encontram distantes uma das outras, transformam em seiva divina que fortalece mais ainda a unidade dos sentimentos, valorizando os tesouros do coração.

A saudade pura não encontra distância no espaço nem no tempo, criando de tal forma um vínculo que mesmo as almas estando separadas, se sentem unidas pela força do amor.

*“A jornada era curta e não sabíamos...
entre nós, foi um dos nossos...
no esplendor da juventude veio a chamada...
Seria agora ou mais tarde, não sabíamos...
Assim, fez a viagem...
Levou tudo, deixou saudade...”*

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto que me mostrou que orientar é muito mais do que podemos apresentar em nossos trabalhos, orientar é dar força para alcançar os sonhos mais impossíveis e fazer com que acreditemos em nosso potencial.

Se hoje sou o que sou, devo grande parte a esta pessoa tão especial.

Não existem palavras que possam expressar minha gratidão pelo seu apoio, paciência, dedicação, orientação segura, pelo tempo e amizade direcionada. Dizer obrigada é pouco, porém a ele acrescento meu eterno carinho.

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

Rui Barbosa

Agradecimentos Especiais

À Prof. Dra. Simone Assis Rosas de Aquino Viegas e ao Prof. Dr. Edgar de Aquino Viegas (in memoriam) pelo exemplo de trabalho, dedicação, perseverança, otimismo e ideal de vida, com quem aprendi o verdadeiro significado de “sorrir, quando a vida diz não”, pelo ombro amigo, a palavra doce, o conselho, o incentivo, o carinho e a preocupação incessante.

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

À Zenaide Maria de Moraes pela ajuda permanente e imprescindível durante todas as etapas do projeto, amizade e valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação durante todos estes anos que passamos juntas, meu reconhecimento e profunda gratidão.

Quando se viaja em direção a um objetivo é muito importante prestar a atenção no caminho.

O caminho é que sempre nos ensina a melhor maneira de chegar, e nos enriquece, enquanto o estamos cruzando.

(Palavras Essenciais – Paulo Coelho)

Agradecimentos Especiais

*“A vida é o encontro de si mesmo,
E nesse encontro descobrimos as nossas deficiências.
Para cada passo que damos necessitamos de ajuda para nos corrigir.
E é nos amigos que nos aprumamos, e que seguimos por caminhos que
nunca pudemos sequer imaginar”.*

Aos amigos, camaradas, companheiros e irmãos: César Alejandro Rodríguez Rosales, Simone R. Ambrósio, Patrícia M. Ohara (Paty Pink), Daniela Ribeiro, Paulo Eduardo Brandão, Laura Villareal e Fábio Gregori.

“Afeto e reciprocidade são particularidades que vivem no coração de cada um. Mais importante que a forma de expressar os sentimentos bons, é a grandeza que existe num ato de amor”. A Antonio César A. Celestino pelo seu carinho, companheirismo e incontestável amor.

À minha família pelo companheirismo nos momentos de alegria, consolo nos momentos de tristeza, carinho, cumplicidade, amor, incentivo, apoio e dedicação...

Agradecimentos

Aos amigos do coração: Simone Myashiro, Adriano Pinter, Sérgio Azevedo, Fernando Ferreira, Marcelo Labruna, Alexandre Sanches, Sandra Sanches, Lara Borges, Rodrigo Soares, Sílvio Luis, Adriana Cortez, Ricardo Augusto, Rosana Tabata, Vera Letticie, Cristina Corsi, Daniel Moura, Leandro D'Arc, Cristina de Jesus, Sabrina e Andréia Fávero.

Amigo é aquela pessoa que o tempo não apaga, que a distância não esquece, que a maldade não destrói.

É um sentimento que vem de longe, que ganha lugar no seu coração e você não substitui por nada.

*É alguém que você sente presente, mesmo quando está longe...
Que vem para o seu lado quando você está sozinho e nunca nega um sentimento sincero.*

Ter amigo não é coisa de um dia, são atos, palavras e atitudes que se solidificam no tempo e não se apagam mais.

Que ficam para sempre como tudo que é feito com o coração aberto.

(Autor Desconhecido)

Agradecimentos

Não importa a ordem da lembrança, a posição profissional, o motivo, a relevância do auxílio prestado... Todos foram importantes...

Àqueles que lembrei, deixo transcrito neste papel os meus sinceros agradecimentos...

Àqueles que por um lapso não fiz jus a esta seção, fica consignado em meu coração, o sentimento de gratidão...

Meu imenso agradecimento e respeito àqueles que tiveram suas vidas tiradas para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Thereza Nunes Martinez que desde o meu primeiro pensamento voltado para a pesquisa, estendeu sua mão e acolheu meus sonhos.

À Sonia da Silva Laborda e Eliene Ferreira dos Santos que estiveram presente no início da minha formação e que estão me acolhendo com todo carinho e apoio no início desta nova jornada.

À Gisele Oliveira de Souza e Orlando Bispo de Souza que procuraram na amizade dar sua parcela de contribuição nessa jornada e pelos inúmeros momentos de alegrias compartilhados.

À Dona Odete pela amizade, eficiência no preparo de materiais para realização dos experimentos e cuidado com os animais.

À Antonio da Costa Martins pela sua amizade sincera.

À Andréa Micke Moreno, Franco Calderaro, Renata Paixão, Daniela Doto, Cleise Gomes, Luciane, Geraldo, enfim à toda família do Laboratório de Sanidade Suína, onde fui acolhida com muito carinho por todos e os quais passei a admirá-los e respeitá-los, o meus sinceros agradecimentos por tudo que me foi oferecido.

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

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Sônia Regina Pinheiro e Simone de Carvalho Balian, pelos ensinamentos e orientações, meu profundo respeito e agradecimento.

À Prof^a. Sylvia Cardoso Leão e a Rosângela S. Oliveira pela amizade e excelente parceria nos trabalhos de pesquisa .

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

Ao Prof. Marcus Amaku pelo auxílio imprescindível na análise estatística e elaboração do modelo matemático.

Ao pessoal da manutenção Suli, Cabelo e Dimião por estarem sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário.

Aos colegas de pós-graduação.

Aos Funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, em especial a Danival, Cristina e Virgínia pela amizade e colaboração constante.

À FAPESP, pelo incentivo financeiro.

Ao final desta jornada, talvez tão ou mais importante do que o título almejado, seja reconhecer verdadeiramente o significado das palavras amizade, companheirismo, gratidão...

A todos, muito obrigada...

Ando devagar porque já tive pressa, e levo esse sorriso porque já chorei demais.

Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, eu só levo a certeza que muito pouco eu sei, ou nada sei.

Conhecer as manhas e as manhãs, o sabor das massas e das maçãs. É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir, é preciso chuva para florir.

Penso que cumprir a vida seja simplesmente compreender a marcha e ir tocando em frente, como velho boiadeiro levando a boiada eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou, estrada eu sou...

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora, um dia a gente chega no outro vai embora. Cada um de nós compõe a sua própria história, e cada ser em si carrega o Dom de ser capaz, de ser feliz.

(Almir Sater/ Renato Teixeira)

RESUMO

OLIVEIRA, E. M. D. **Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium* em suínos.** [Study of the *Mycobacterium avium* horizontal transmission in swine]. 2005. 85 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Haja vista a existência de quatro famílias de *M. avium* molecularmente distintas circulando na população de suínos do Sul do Brasil, a diferença de virulência constatada entre essas quatro famílias, a influência da virulência nos mecanismos de transmissão, as dúvidas existentes a respeito da existência e da importância da transmissão horizontal de *M. avium* em suínos e do significado desse conhecimento para o estabelecimento de métodos de controle eficientes, o presente projeto tem por objetivos: 1) Padronizar método de isolamento de micobactérias a partir de fezes suínas; 2) Caracterizar a eliminação de *M. avium* pelas fezes em suínos experimentalmente infectados pela via oral; 3) Verificar se existe transmissão horizontal entre suínos durante a fase de eliminação ativa, através de experimentos envolvendo infecção oral e exposição de animais contactantes; 4) Estudar, através de modelagem matemática, a dinâmica da infecção por *M. avium* em uma população suína. Como resultados, para cada um dos itens obteve-se: 1) Houve diferença significativa entre os protocolos de recuperação de micobactérias a partir de fezes de suínos ($p < 0,05$) e o método ácido com ressuspensão em solução de anfotericina B e semeadura

em meio de Lowenstein-Jensen com antibióticos apresentou o maior percentual de recuperação (87%); 2) Foram constados dois períodos de eliminação fecal de MAC em suínos: um inicial, relativo à eliminação residual do inóculo, do 1º ao 4º, e um segundo, com início no 18º e término no 62º dias pós-inoculação, este último é resultado de suposta lesão aberta para a luz do intestino; 3) Cinco, dos sete animais contactantes, infectaram-se com o *M. avium*, estirpe PIG B e 4) A simulação matemática da doença, considerando a transmissão horizontal como mecanismo principal da ocorrência de condenações em matadouro por linfadenite granulomatosa é inconsistente com o que se observa na população. Portanto, o componente ambiental tem papel preponderante na dinâmica das infecções micobacterianas dos suínos produzidos no Brasil.

Palavras-chave: Complexo *Mycobacterium avium*. Suínos. Linfadenite granulomatosa. Transmissão horizontal.

ABSTRACT

OLIVEIRA, E. M. D. **Study of the *Mycobacterium avium* horizontal transmission in swine.** [Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium* em suínos]. 2005. 85 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Considering four genetic distinct *M. avium* families within the swine population of the Southern Brazil, the virulence difference detected among them, the virulence influence on the transmission mechanisms, the current doubts concerning *M. avium* horizontal transmission existence and importance in swine and about its knowledge meaning in order to stablish efficient control programs, the objectives of the present study were: 1) to set in a standard mycobacterial isolation method from swine feces; 2) to characterize *M. avium* excretion through feces in swine infected orally; 3) to verify the existence of horizontal transmission among swine during the active elimination phase, by experiments involving oral infection and exposure of contacting animals; 4) to study, through mathematical modelling, *M. avium* infection dynamics in a swine population. These are the attained results for each of the items: 1) there was a significant difference ($p < 0.05$) between the mycobacterial recovery protocols from swine feces and the acid method with suspension in amphotericin solution and inoculation in Lowenstein-Jensen media with antibiotics presented the greatest recovery percentage (87%); 2) two fecal elimination periods of *M. avium* in swine feces were observed: an initial one, relative to the residual elimination of the inoculum,

within days 1 and 4, and a second one, starting at day 18 and ending at day 62 post inoculation - the last one results from a supposed lesion opened to the intestinal lumen. 3) Five out of seven contacting animals were infected with *M. avium*; 4) The mathematical simulation of the disease, considering the horizontal transmission as the major mechanism of occurrence of condemnation at slaughterhouses due to granulomatous lymphadenitis is not consistent with what is observed in the population. Therefore, the environmental component plays a preponderant role in the mycobacterial infections dynamics of swine raised in Brazil.

Keywords: *Mycobacterium avium* complex. Swine. Granulomatous lymphadenitis. Horizontal transmission.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Eficiência de diferentes métodos de descontaminação visando o isolamento de <i>Mycobacterium avium</i> de fezes suínas – São Paulo – 2005.....	55
Tabela 2 -	Valores de "p" resultantes das comparações dos métodos de descontaminação para recuperação de <i>Mycobacterium avium</i> a partir de fezes suínas (teste de comparação de duas proporções) - São Paulo – 2005.....	57
Tabela 3 -	Isolamento de <i>Mycobacterium avium</i> a partir de fezes de suínos em vários dias pós-inoculação oral – São Paulo – 2005.....	59
Tabela 4 -	Eliminação fecal de <i>M. avium</i> em suíno experimentalmente infectado com a estirpe PIG B, segundo os dias pós-inoculação– São Paulo – 2005...	61
Tabela 5 -	Isolamento de <i>M.avium</i> das fezes dos animais contactantes– São Paulo – 2005.....	62
Tabela 6 -	Isolamento de <i>M.avium</i> dos órgãos dos animais contactantes – São Paulo – 2005.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Freqüência de condenação de carcaças de suínos por linfadenite granulomatosa na granja A – São Paulo – 2005.....	30
Figura 2 -	Freqüência de condenação de carcaças de suínos por linfadenite granulomatosa na granja C – São Paulo – 2005.....	31
Figura 3 -	Esquema de compartimentos que descreve o fluxo de animais em uma granja de suínos e a dinâmica de transmissão de <i>Micobacterium avium</i> – São Paulo – 2005.....	45
Figura 4 -	Proporção de recuperação de <i>M. avium</i> a partir de fezes suínas, em 12 procedimentos testados – São Paulo – 2005.....	56
Figura 5 -	Média de UFC de <i>Mycobacterium avium</i> eliminada pelas fezes de suínos experimentalmente infectados, segundo os dias pós-inoculação – São Paulo – 2005.....	60
Figura 6 -	Número de animais nos diversos compartimentos ao longo do tempo, para diferentes valores de força de infecção ((a) $\lambda = 0,001 \text{ ano}^{-1}$, (b) $\lambda = 0,005 \text{ ano}^{-1}$ e (c) $\lambda = 0,05 \text{ ano}^{-1}$) – São Paulo – 2005.....	64
Figura 7 -	Proporção de infectados no final da fase de creche, em função da força de infecção. Os gráficos (a) e (b) referem-se a diferentes intervalos de valores para a força de infecção – São Paulo – 2005.....	65
Figura 8 -	Proporção de infectados no final da fase de creche, em função do tempo em dias.– São Paulo – 2005.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

7H9	Meio líquido de cultivo para micobactérias
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome”
g	Gramma
HIV	“Human Immunodeficiency vírus”
MAC	<i>Complexo Mycobacterium avium</i>
MOTT	Micobactérias outras que não as tuberculosas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PRA	“PCR-Restriction Enzyme Analysis”
RFLP	“Restriction fragment Length Polymorphism
U.F.C.	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	MATERIAL E MÉTODO	33
2.1	Agente Infectante.....	33
2.2	EXPERIMENTO 1.....	33
2.2.1	Delineamento Experimental	34
2.2.2	Tratamento Estatístico.....	38
2.3	EXPERIMENTO 2.....	38
2.3.1	Animais.....	38
2.3.2	Preparo do Inóculo.....	39
2.3.3	Delineamento Experimental	41
2.4	EXPERIMENTO 3.....	42
2.4.1	Animais.....	42
2.4.2	Delineamento Experimental	43
2.5	EXPERIMENTO 4.....	44
3	RESULTADOS	53
3.1	EXPERIMENTO 1.....	53
3.2	EXPERIMENTO 2.....	58
3.3	EXPERIMENTO 3.....	60
3.4	EXPERIMENTO 4.....	63

4	DISCUSSÃO	69
4.1	EXPERIMENTO 1.....	69
4.2	EXPERIMENTO 2.....	71
4.3	EXPERIMENTO 3.....	72
4.4	EXPERIMENTO 4.....	74
5	CONCLUSÕES	77
5.1	EXPERIMENTO 1.....	77
5.2	EXPERIMENTO 2.....	77
5.3	EXPERIMENTO 3.....	78
5.4	EXPERIMENTO 4.....	78
	REFERÊNCIAS	80

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

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

As micobactérias fazem parte do gênero *Mycobacterium*, único gênero da família das *Mycobacteriaceae* dentro da subordem *Corynebacteriaceae*, ordem dos *Actinomicetales* (SHINNICK et al., 1994). O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) é composto por bactérias de crescimento lento, classificadas sorologicamente em 28 sorovares e pertencentes a duas espécies, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (SAITO, 1990).

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

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

Programas de erradicação da tuberculose bovina, como aquele iniciado em 1917, nos Estados Unidos (REIS, 1965), não incluíram a espécie suína, considerando que a prevalência nessa espécie seria reduzida em consequência das medidas profiláticas aplicadas para os rebanhos bovinos (THOEN; KARLSON, 1986). Mas a execução de tais programas alcançando

prevalências bastante baixas na população bovina em países como Alemanha, Bélgica, Inglaterra, França e Portugal, chegando a erradicar a tuberculose bovina na Dinamarca, Holanda e Luxemburgo (CAFFREY, 1994) não garantiu a eliminação das linfadenites granulomatosas nos suínos.

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

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

Estudos de inoculação experimental de *M. avium* em suínos, via oral, demonstraram que o foco primário de lesão se dá nas tonsilas, seguido dos linfonodos mandibulares (ACLAND; WHITLOCK, 1984), detectando-se lesões nos linfonodos mesentéricos, que tornam-se macroscópicas a partir de quatro meses (ELLSWORTH et al., 1980).

A infecção em suínos não apresenta sinais clínicos, sendo detectada somente ao abate, pelo serviço de inspeção de carnes. O complexo primário é dificilmente detectável pela inspeção macroscópica, mas microscopicamente pode-se observar tubérculos na mucosa da faringe e intestino delgado, enquanto as lesões macroscópicas são vistas mais freqüentemente nos linfonodos cervicais e mesentéricos, embora outros órgãos possam ser atingidos. As lesões granulomatosas de natureza proliferativa apresentam-se macroscopicamente como áreas caseosas, de coloração branca amarelada que variam desde pequenos focos com poucos milímetros até lesões difusas podendo atingir todo o linfonodo e microscopicamente caracterizam-se por proliferação de células epitelióides e células gigantes, podendo ocorrer necrose e calcificação, os linfonodos apresentam-se aumentados de tamanho e de consistência firme. (MORÉS et al., 2001).

O gênero *Mycobacterium* é altamente exigente no que se refere a nutrientes e requer um tempo maior para a sua multiplicação, quando comparados com outras bactérias patogênicas. Tais características facilitam a multiplicação anterior de contaminantes menos exigentes, tornando indispensável a aplicação de um tratamento das amostras previamente à tentativa de isolamento de micobactérias. Em virtude dessas características a descontaminação é um procedimento indispensável para amostras consideradas não estéreis ou contaminadas tais como: lavados bronquiais, materiais de necrópsias, secreções purulentas e fezes entre outras.

Uma ampla variedade de combinações de soluções e concentrações de substâncias químicas que buscam a máxima inativação de microbiota acompanhante das amostras e a mínima injúria às micobactérias presentes tem sido utilizadas. Pode-se citar a descontaminação com o ácido oxálico (JORGENSEN, 1982) e o hexadecylpyridinium chloride (CORNER, et al., 1995). São encontrados protocolos que utilizam o lauril sulfato de sódio, método de Corper e Stoner modificado (fosfato trissódico a 23% e fosfato monossódico a 20%); o método de Kubica e Dye (N-acetil-L-cisteína-hidroxido de sódio = NALC-NAOH); o método do cloreto de cetilpiridínico (CCP) e o método Lowenstein-Jensen (ácido sulfúrico a 15%) (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973, 1979; DAVID et al., 1994; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL), 1994).

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

Na atual fase do projeto "Epidemiologia e controle das micobacterioses suínas no sul do Brasil" (Processo FAPESP 1998/11746-1) já foi possível constatar que o microrganismo de maior importância na ocorrência das

micobacterioses suínas é o *Mycobacterium avium* (LEÃO et al., 1999) e que existem quatro diferentes famílias de estirpes desse agente circulando na região. (PIG-A, B, C e D) A caracterização das espécies de micobactérias foi realizada com métodos moleculares (PCR *Restriction Analysis* - PRA) e a variabilidade de estirpes de *M. avium* foi determinada pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), conforme metodologia preconizada por Van Soolingen et al. (1998).

Oliveira et al. (2002), estudando a virulência dessas estirpes através de infecções experimentais em hamster, constatou que existe diferença entre elas e foi possível construir uma escala decrescente de virulência para essas quatro estirpes (PIG B > PIG A > PIG D > PIG C). Os autores também verificaram que a estirpe mais virulenta foi a mais freqüentemente isolada de suínos em matadouro, sugerindo que a maior virulência significa maior capacidade de perpetuação e difusão dentro da população. Assim sendo, é razoável supor que se a transmissão horizontal existe entre suínos, ela será mais frequente e importante quando do envolvimento das estirpes mais virulentas.

Na região Sul, as condenações por linfadenite granulomatosa têm comportamento sazonal, concentrando-se de junho a outubro, o que significa um período de maior transmissibilidade entre os meses de fevereiro a final de junho (MARTINS, 2001). Silva (2003), para validar a intervenção que emergiu do estudo dos fatores de risco, precisou selecionar granjas

problema, ou seja, granjas que tiveram animais condenados em abatedouro por exibirem linfadenite granulomatosa. A intervenção foi iniciada em junho de 2001 e o nível de condenação dessas granjas foi acompanhado no tempo. Os resultados constam das figuras 1 e 2.

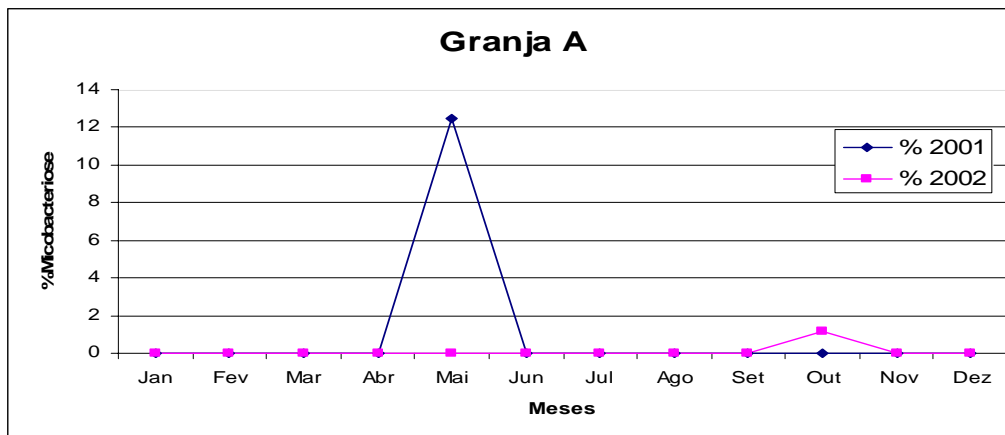


Figura 1 - Frequência de condenação de carcaças de suínos por linfadenite granulomatosa na granja A – São Paulo – 2005

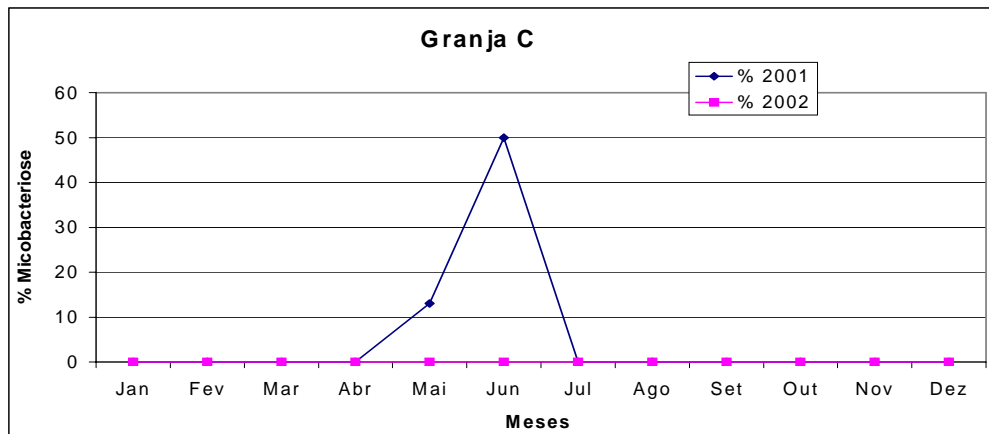


Figura 2 - Frequência de condenação de carcaças de suínos por linfadenite granulomatosa na granja C – São Paulo - 2005

Haja vista a existência de quatro famílias de *M. avium* molecularmente distintas circulando na população de suínos do Sul do Brasil, a diferença de virulência constatada entre essas quatro famílias, a influência da virulência nos mecanismos de transmissão, as dúvidas existentes a respeito da existência e da importância da transmissão horizontal de *M. avium* em suínos e do significado desse conhecimento para o estabelecimento de métodos de controle eficientes, o presente projeto tem por objetivos:

- 1) Padronizar método de isolamento de micobactérias a partir de fezes suínas.
- 2) Caracterizar a eliminação de *M. avium* pelas fezes em suínos experimentalmente infectados pela via oral.
- 3) Verificar se existe transmissão horizontal entre suínos durante a fase de eliminação ativa, através de experimentos envolvendo infecção oral e exposição de animais contactantes.
- 4) Estudar, através de modelagem matemática, a dinâmica da infecção por *M. avium* em uma população suína

MATERIAL E MÉTODO

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 AGENTE INFECTANTE

Em todos os experimentos descritos a seguir foi utilizada a estirpe PIG-B, isolada de suínos oriundos da região Sul do Brasil. Dentre as quatro famílias de *M. avium*, caracterizadas pela técnica de RFLP (SIRCILLI, 2000), encontradas nestes suínos, esta estirpe apresentou maior capacidade de se multiplicar nos tecidos de hamsters (OLIVEIRA et al., 2002).

2.2 EXPERIMENTO 1

Comparação de métodos para isolamento de micobactérias a partir das fezes.

Com o intuito de aperfeiçoar o método de isolamento de micobactérias das fezes, foram realizadas trinta repetições de diferentes métodos de descontaminação.

2.2.1 Delineamento Experimental

Amostras de fezes de suínos foram contaminadas artificialmente com 0,01g da estirpe PIG-B e submetidas à tentativa de isolamento de micobactérias, utilizando-se os seguintes protocolos de descontaminação:

- 1) Petroff modificado ou método básico (PINHEIRO et al., 1992);
- 2) Lowenstein-Jensen modificado ou método ácido (ROMÁN, 1990);
- 3) Petroff modificado ou método básico ressuspendido com anfotericina B;
- 4) Lowenstein-Jensen modificado ou método ácido ressuspendido com anfotericina B.

Os inóculos obtidos destes quatro tratamentos foram semeados em meios

de Petragnani, Lowenstein-Jensen e Lowenstein-Jensen acrescido de antibióticos (50 UI de penicilina G/mL de meio e 350 µg de ácido nalidíxico/mL de meio).

O inóculo de *M. avium* utilizado para contaminar as fezes foi cultivado nos diferentes meios de cultura.

Um grama de cada amostra de fezes contaminada experimentalmente foi homogeneizado com 9mL de salina 0,85%, filtrado e deixado em repouso por 10 minutos. Do sobrenadante 100 μ L foram inoculados diretamente nos meios de cultura e alíquotas de 1mL foram submetidas a cada um dos métodos de descontaminação.

O método básico foi realizado acrescentando-se à amostra 1 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% e duas gotas de vermelho de fenol, agitando-se e em seguida incubando-se a 37°C por 20 minutos. Após este período foi acrescentado a solução de ácido clorídrico (HCl) a 1N até a mudança de cor do vermelho para a cor tijolo e estabilização do pH entre 6,5 e 7,0. O resultado foi denominado tubo A.

O método ácido foi realizado acrescentando-se à amostra 1 mL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 12% e duas gotas de vermelho de fenol, agitando-se e em seguida incubando-se a 37°C por 20 minutos. Após este período foi acrescentado a solução de hidróxido de sódio a 4% até a mudança de cor do amarelo para a cor tijolo e estabilização do pH entre 6,5 e 7,0. O resultado foi denominado tubo B.

Daí em diante, os tubos A e B foram submetidos à mesma seqüência, qual seja:

- 1) Centrifugação a 1000G por 20 minutos;

- 2) Desprezo do sobrenadante;
- 3) Ressuspensão do sedimento com 2,0 mL de solução salina estéril;
- 4) Homogeneização da suspensão seguida de semeadura de 100 μ L em cada um dos tubos contendo meios de Petraghani, Lowenstein-Jensen e Lowenstein-Jensen com antibióticos.

Esse procedimento foi feito em duplicata. Para o Petroff modificado ou método básico com adição de anfotericina B e o Lowenstein-Jensen modificado ou método ácido com adição de anfotericina B foi realizado o mesmo procedimento, ressuspendendo-se o sedimento com 2,0 mL de anfotericina B(250 μ g/mL) (tubos C e D respectivamente).

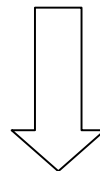
Os tubos foram então incubados em estufa a 37°C, horizontalmente a um ângulo de aproximadamente 30° e mantidos com as tampas semi-abertas até a completa secagem da superfície do meio. Em seguida foram mantidos em estufa, na posição vertical e examinados a cada sete dias durante quatro semanas.

As leituras foram feitas aos 32 dias de incubação, onde foram observadas a presença de micobactérias (recuperação do agente) e a existência de contaminação.

Segue na próxima página um esquema do protocolo empregado.

PROTOCOLO: MÉTODOS PARA ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS A PARTIR DAS FEZES

1g de Fezes + 0,02g de estirpe PIG-B + 9mL de Sol. Sal. 0,85%



Filtrar
Repouso por 10 min.

MÉTODO BÁSICO

MÉTODO ÁCIDO

1mL sobrenadante

+

1mL NaOH a 4%

+

2 gotas de vermelho fenol



Agita
Incuba 37°C/20'

1mL HCl 1N
(mudança de cor **vermelho** para **tijolo** pH 6,5 a 7,0)



TUBOS A e C

1mL sobrenadante

+

1mL H₂SO₄ 12%

+

2 gotas de vermelho fenol



Agita
Incuba 37°C/20'

1mL NaOH a 4%
(mudança de cor **vermelho** para **tijolo** pH 6,5 a 7,0)



TUBOS B e D

Centrifugação
1000G/ 20'



Desprezar sobrenadante

TUBOS A e B



Ressuspender o sedimento c/
2mL Sol. Sal. 0,85%

TUBOS C e D



Ressuspender o sedimento c/
2mL de anfotericina B (250µg/mL)

Semear 100µL em meios Petragnani, Lowenstein-Jensen c/ antibiótico (Penicilina G e Ácido nalidíxico) e Lowenstein-Jensen s/ antibiótico (duplicatas) → Incubar 37°C/ 32 dias

2.2.2 Tratamento Estatístico

As proporções de recuperação do agente observadas para cada um dos 12 métodos foram comparadas através de teste de comparação de duas proporções, realizado pelo programa Minitab 13. Para o cálculo das proporções de recuperação (30 – contaminados), foi adotado o seguinte critério: como os inóculos foram semeados em duplicata, a amostra foi considerada contaminada sempre que apresentasse pelo menos um único tubo contaminado.

2.3 EXPERIMENTO 2

Caracterização da eliminação de *M. avium* pelas fezes em suínos experimentalmente infectados pela via oral.

2.3.1 Animais

Foram utilizados oito leitões, sendo cinco machos e três fêmeas, com três semanas de idade, oriundos de granja livre onde não houve registro de

condenação por tuberculose nos últimos 12 meses, mantidos em baias apropriadas localizadas no Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ-USP, identificados com as letras A; B; C; D; E; F; G e H. Durante o experimento os animais receberam ração comercial e água. As baias foram lavadas diariamente.

2.3.2 Preparo do Inóculo

1ª. Fase

Passagem da estirpe PIG-B em hamster. Foram pesados 0,01g de colônias de micobactérias e diluídas em 05mL de solução salina 0,85% estéril. O inóculo foi preparado em frasco estéril contendo pérolas de vidro para facilitar a dispersão das bactérias no veículo de maneira que cada 0,5mL tivesse 1,0mg de micobactérias. Foram inoculados dois hamsters com 0,5mL pela via intra-peritoneal. Após 13 dias os hamsters foram sacrificados em câmara de CO₂, em seguida os hamsters foram imersos em solução 1/30 de hipoclorito de sódio, durante 15 minutos, após o que foram feitas colheitas estéreis do baço para o cultivo de micobactérias em meio Petraghani. Os cultivos foram mantidos em estufa a temperatura 37°C, durante 30 dias.

2ª. Fase

Pré-inóculo. A estirpe PIG-B até então cultivadas em meio Petragnani foi passada para o meio líquido 7H9 e colocada para incubar a 37°C. Após 7 dias de incubação, observou-se ótimo crescimento do pré-inóculo, do qual foi passado 10µL para 10mL de 7H9 e incubado a 37°C até obter bom crescimento o que ocorreu com após 2 dias. Em seguida adicionou-se solução salina 0,85% estéril no tubo até obter-se a concentração 10^9 bactérias/mL da escala de Mac Farland. Em seguida o inóculo obtido foi distribuído em 12 eppendorfs e congelados a temperatura - 80°C. Após 10 dias um eppendorf representativo foi descongelado, diluído seriadamente na razão 10 e cada diluição foi semeado em meio Petragnani para a contagem de U.F.C. 15 dias após a sementeira.

A partir das contagens obtidas foi possível estabelecer a estratégia de inoculação, de modo a garantir que cada animal do experimento, receba 10^{10} unidades formadoras de colônias (U.F.C.) de *M. avium*.

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

2.3.3 Delineamento Experimental

Foram formados três grupos experimentais. Dois deles, contendo três animais - dois machos e uma fêmea -, foram experimentalmente infectados com o inóculo descrito acima. O terceiro grupo, representado por dois animais - um macho e uma fêmea -, permaneceu como controle. Cada um dos grupos foi mantido em uma baia exclusiva durante todo o experimento.

No dia zero o inóculo foi administrado em cada animal pela via oral, utilizando uma seringa, depositando-se a suspensão na parte superior da língua para que houvesse a deglutição.

De todos os animais, foram colhidas amostras de fezes antes da inoculação e diariamente até o 10º dia pós-inoculação. A partir do 11º dia esse procedimento foi realizado a cada 04 dias até 118 dias. Todas as amostras foram submetidas à tentativa de isolamento pelo método que apresentou o melhor desempenho no experimento 1.

Aos 119 dias os animais foram anestesiados com Telazol® e sacrificados com cloreto de magnésio.

2.4 EXPERIMENTO 3

Verificar se existe transmissão horizontal entre suínos durante a fase de eliminação ativa, através de experimentos envolvendo infecção oral e exposição de animais contactantes.

2.4.1 Animais

Foram utilizados nove leitões, sendo cinco fêmeas e quatro machos, com três semanas de idade, oriundos de granja livre onde não houve registro de condenação por tuberculose nos últimos 12 meses, mantidos em baias apropriadas localizadas no Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ-USP, identificados com as letras A; B; C; D; E; F; G; H e I. Durante o experimento os animais receberam ração comercial e água e as baias foram lavadas com água em dias alternados.

2.4.2 Delineamento Experimental

Um leitão foi inoculado com a estirpe PIG-B, via oral, com a dose de 10^{10} U.F.C., conforme descrito no experimento 2. Dezesesseis dias após a inoculação, esse animal foi colocado em contato com sete leitões não inoculados para verificação da existência de transmissão horizontal. Um animal foi mantido em baia separada, como controle.

Do animal experimentalmente infectado foram colhidas amostras de fezes antes (aos -6 e -4 dias) e depois da inoculação (aos 1, 2, 3, 4, 5, 16, 20, 25, 29, 32, 39, 43, 46, 50, 53, 57, 60, 64, 71, 78 , 85, 92, 95 e 103 dias).

Dos animais contactantes foram colhidas amostras de fezes antes (aos -6 e -4 dias) e depois do contato (aos 4, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30, 34, 37, 41, 44, 48, 55, 62, 69, 76, 79 e 87 dias).

As amostras de fezes foram submetidas à tentativa de isolamento de micobactérias pelo método que apresentou o melhor desempenho no experimento 1, ou seja, o método ácido com ressuspensão em solução de anfotericina B e semeadura em meio de Lowenstein-Jensen com antibióticos.

Nos dias 87 e 88 após o contato, todos os animais foram anestesiados com Telazol[®] e sacrificados com cloreto de magnésio. Após o que, foram feitas colheitas de tonsilas, fígado, baço e linfonodos do trato digestivo, os

quais foram submetidos à tentativa de isolamento pelo método de descontaminação pelo HPC (Hexadecylpyridinium chloride)(CORNER et al., 1995). Apenas os órgãos dos quais foi isolado *M. avium* foram submetidos ao exame histológico.

2.5 EXPERIMENTO 4

Estudar, através de modelagem matemática, a dinâmica da infecção por *M. avium* em uma população suína.

Para descrever a dinâmica de transmissão de *M. avium* em granjas de suínos, foi elaborado um modelo de compartimentos (MASSAD, et al.; 2004.; O. DIEKNANN, 2000). Como esse modelo visava a estimar a relação entre taxa de infecção e proporção de suínos que apresentam lesões, detectadas no abate aos 150 dias de idade, resultantes de infecção por *M. avium*, considerou-se que a dinâmica da doença poderia ser descrita por dois compartimentos de animais: suscetíveis à infecção, e infectados que poderiam vir a apresentar lesões. Esta é uma simplificação que procura tornar o modelo parcimonioso o suficiente para que possa descrever o

fenômeno de interesse, sem acrescentar um grau de complexidade matemática que tornaria o modelo difícil de ser tratado e interpretado.

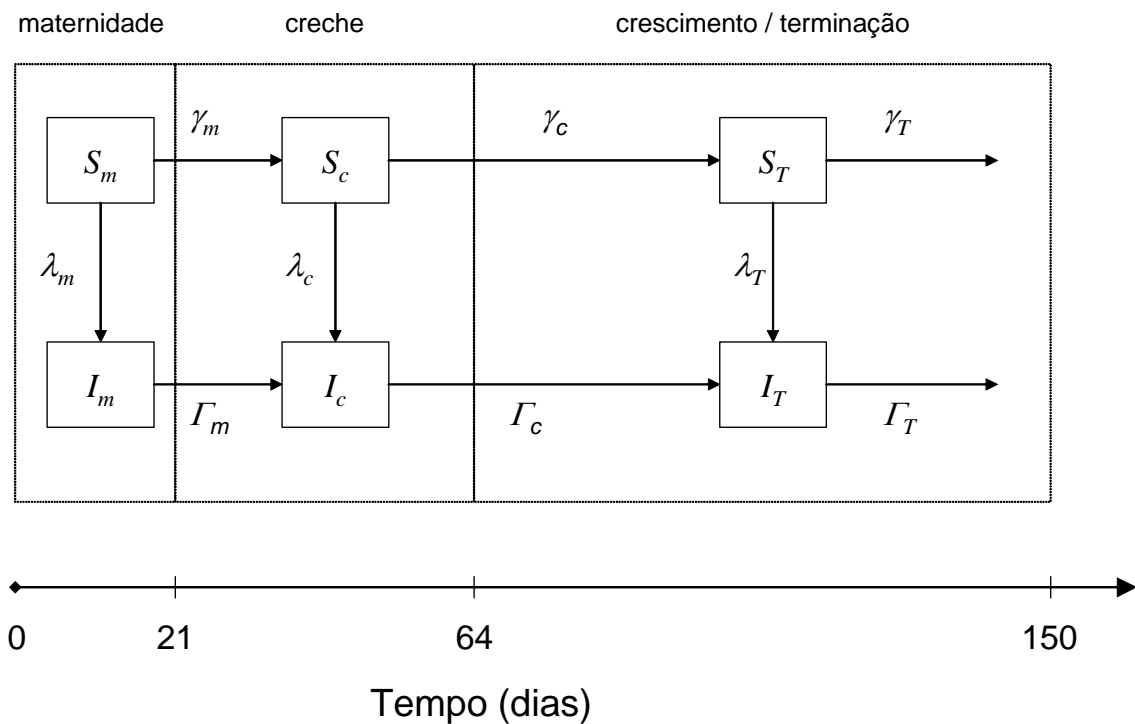


Figura 3 - Esquema de compartimentos que descreve o fluxo de animais em uma granja de suínos e a dinâmica de transmissão de *Micobacterium avium* - São Paulo - 2005

Também foram consideradas três fases pelas quais passam os suínos em uma granja padrão, a saber, maternidade, creche e crescimento/terminação. Assim, como se pode observar na figura 1, os animais poderão estar na fase de maternidade e serem ou suscetíveis (S_m)

ou infectados (I_m); suscetíveis (S_c) ou infectados (I_c) na fase de creche; ou, por último, suscetíveis (S_T) ou infectados (I_T) na fase de crescimento e terminação. O modelo de compartimentos que procura descrever a dinâmica de transmissão da doença em uma granja, conjuntamente com o fluxo de animais nas diferentes fases de crescimento, é o seguinte:

$$\begin{aligned}
 \frac{dS_m(t)}{dt} &= \eta(t) - \lambda_m S_m - \gamma_m(t) \\
 \frac{dS_c(t)}{dt} &= \gamma_m(t) - \lambda_c S_c - \gamma_c(t) \\
 \frac{dS_T(t)}{dt} &= \gamma_c(t) - \lambda_T S_T - \gamma_T(t) \\
 \frac{dI_m(t)}{dt} &= \lambda_m S_m - \Gamma_m(t) \\
 \frac{dI_c(t)}{dt} &= \lambda_c S_c + \Gamma_m(t) - \Gamma_c(t) \\
 \frac{dI_T(t)}{dt} &= \lambda_T S_T + \Gamma_c(t) - \Gamma_T(t)
 \end{aligned} \tag{1}$$

onde γ_m é a taxa de transferência de suscetíveis entre maternidade e creche, γ_c a taxa de transferência entre creche e terminação, e γ_T é a taxa de saída de suscetíveis da fase de terminação (Figura 3). Por sua vez, Γ_m é a taxa de transferência de animais infectados entre maternidade e creche, Γ_c a taxa entre creche e terminação e Γ_T se refere à saída de animais infectados da fase de terminação. Essas taxas foram consideradas constantes, o que é equivalente a ter um número fixo de animais transferidos de uma fase para outra em um certo período de tempo. A taxa $\eta(t)$ é uma taxa de reposição ou natalidade de suínos na maternidade. A taxa *per capita* de infecção por

unidade de tempo, também conhecida como força de infecção, está representada pelos símbolos λ_m , λ_c e λ_T para as fases de maternidade, creche e terminação, respectivamente. No sistema de equações acima e no restante do texto, optou-se por utilizar o símbolo t para indicar tempo, e T para indicar a fase de terminação.

A força de infecção é basicamente o resultado do produto de dois fatores: a taxa de contatos *per capita* potencialmente infectantes, β , e do número (I) ou densidade de infectados (dependendo do modo de transmissão, da fração de infectados na população). Pode ser descrita como:

$$\lambda = \beta I \quad (2)$$

A taxa de contatos potencialmente infectantes, por sua vez, pode ser decomposta no seguinte produto:

$$\beta = \beta_{\text{cont}} \beta_{\text{inf}} \quad (3)$$

onde β_{cont} representa o número de contatos *per capita* por unidade de tempo entre indivíduos de uma população, dependendo, por sua vez, da estrutura de contatos existente entre esses indivíduos, e β_{inf} é a probabilidade de haver infecção caso o contato se dê entre um indivíduo infectado e outro suscetível. Este último componente pode depender de características relacionadas ao agente, como virulência e infectividade. O raciocínio prévio sobre β se aplica a doenças de transmissão direta por contato indivíduo-a-

indivíduo, mas também a doenças cuja transmissão seja mediada pelo ambiente, nos casos em que o agente permaneça viável no ambiente, por exemplo.

Cabe ressaltar que, sob o ponto de vista da transmissão da doença, o modelo é essencialmente composto por dois compartimentos, suscetíveis e infectados. Os números totais de suscetíveis e de infectados são dados por:

$$\begin{aligned} S(t) &= S_m(t) + S_c(t) + S_T(t) \\ I(t) &= I_m(t) + I_c(t) + I_T(t) \end{aligned} \quad (4)$$

e o número total de suínos é:

$$N(t) = S(t) + I(t) \quad (5)$$

Se somarmos as equações do sistema (1), obteremos:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \eta(t) - [\gamma_T(t) + \Gamma_T(t)] \quad (6)$$

Para que o número total de suínos na granja permaneça constante ao longo do tempo, uma condição que deve ser respeitada é:

$$\frac{dN(t)}{dt} = 0 \quad (7)$$

o que é equivalente a :

$$\eta(t) = \gamma_T(t) + \Gamma_T(t) \quad (8)$$

De modo análogo, para que o número de animais se mantenha constante em cada fase, relações similares às equações (7) e (8) se aplicarão, e deveremos ter:

$$\gamma_m(t) + \Gamma_m(t) = \gamma_c(t) + \Gamma_c(t) = \gamma_T(t) + \Gamma_T(t) = \eta(t) \quad (9)$$

o que é equivalente a ter um número constante de suínos sendo transferidos de uma fase para outra da granja, por unidade de tempo.

Uma condição que faz com que a relação acima seja obedecida é a seguinte:

$$\frac{N_m}{\Delta t_m} = \frac{N_c}{\Delta t_c} = \frac{N_T}{\Delta t_T} \quad (10)$$

onde N_m , N_c e N_T são, respectivamente, os números totais de suínos nas fases de maternidade, creche e terminação, e nos denominadores das frações temos os tempos de permanência em cada uma dessas fases.

Por simplicidade, para que o período de permanência em uma fase fosse a metade do tempo de permanência do animal na fase anterior, adotamos os seguintes períodos

$$\begin{aligned} \Delta t_T &= 86 \text{ dias} \\ \Delta t_c &= 43 \text{ dias} \\ \Delta t_m &= 21,5 \text{ dias} \end{aligned} \quad (11)$$

e, por conseguinte, para que seja respeitada a expressão (10), adotamos como condições iniciais

$$\begin{aligned} N_T(0) &= 200 \\ N_c(0) &= 100 \\ N_m(0) &= 50 \end{aligned} \quad (12)$$

Também por simplicidade foi feita a suposição de que os valores das taxas de infecção λ_m , λ_c e λ_T sejam constantes e iguais. Ainda que a

densidade de animais nas baias seja diferente nas diferentes fases e isso possa afetar a intensidade de transmissão da infecção, pode-se admitir que variando os valores da força de infecção teremos um espectro de possíveis resultados que contemplarão o efeito combinado da transmissão nas diversas fases.

O tempo total de permanência do suíno na granja, da maternidade à terminação, está em torno de 150 dias. Para que o animal infectado apresente lesão no momento do abate, é necessário que este tenha se infectado pelo menos 3 meses antes. Conclui-se, deste modo, que o animal que apresenta lesão se infectou no final da fase de creche ou anteriormente. Com base nessas informações, foi elaborado o seguinte procedimento para análise do efeito de diferentes forças de infecção: para a força de infecção foram adotados diferentes valores e, para cada valor, foi feita a estimativa da proporção de suínos infectados no final da fase de creche. Esta proporção deve corresponder à proporção de animais que apresentam lesão no abate.

Quanto à transferência dos animais de uma fase para outra, como o modelo é composto por suscetíveis e infectados em proporções distintas, assumimos que o número de animais suscetíveis transferidos de uma fase para outra seria proporcional ao número total de suscetíveis na fase de origem, seguindo um raciocínio análogo para os infectados. Como se pode observar nas expressões (9) e (10), foi suposto que as taxas de

transferência entre as fases seriam iguais. Deste modo, sendo a taxa de transferência total de uma fase para outra dada por γ constante, as taxas de transferência entre os compartimentos seriam:

$$\begin{aligned}
 \gamma_m(t) &= \gamma \frac{S_m(t)}{S_m(t) + I_m(t)} \\
 \Gamma_m(t) &= \gamma \frac{I_m(t)}{S_m(t) + I_m(t)} \\
 \gamma_c(t) &= \gamma \frac{S_c(t)}{S_c(t) + I_c(t)} \\
 \Gamma_c(t) &= \gamma \frac{I_c(t)}{S_c(t) + I_c(t)} \\
 \gamma_T(t) &= \gamma \frac{S_T(t)}{S_T(t) + I_T(t)} \\
 \Gamma_T(t) &= \gamma \frac{I_T(t)}{S_T(t) + I_T(t)}
 \end{aligned} \tag{13}$$

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1

O inóculo apresentou a mesma intensidade de crescimento nos três meios de cultura, indicando que a presença de antibióticos no meio de Lowenstein-Jensen não interferiu na multiplicação do *M. avium*, estirpe PIG B.

Todas as 30 amostras de fezes experimentalmente infectadas com *M. avium*, estirpe PIG B, foram semeadas nos três meios de cultura, em duplicata, sem a realização de qualquer procedimento de descontaminação prévia, mostrando a presença de contaminação em todas as oportunidades. Esse resultado confirma a necessidade da realização de descontaminação das amostras de fezes suínas quando o objetivo é isolar micobactérias.

As tabelas 1 e 2 e a figura 4 trazem os resultados obtidos no experimento 1. Esses resultados permitiram elaborar a seguinte escala de sucesso no percentual de recuperação de *M. avium*: 87% (26/30), 80% (24/30), 70% (21/30), 63% (19/30), 60% (18/30), 53% (16/30), 47% (14/30), 37% (11/30), 30% (9/30) e 27% (8/30) ($p < 0,05$). (Gráfico 1 e Tabelas 1 e 2)

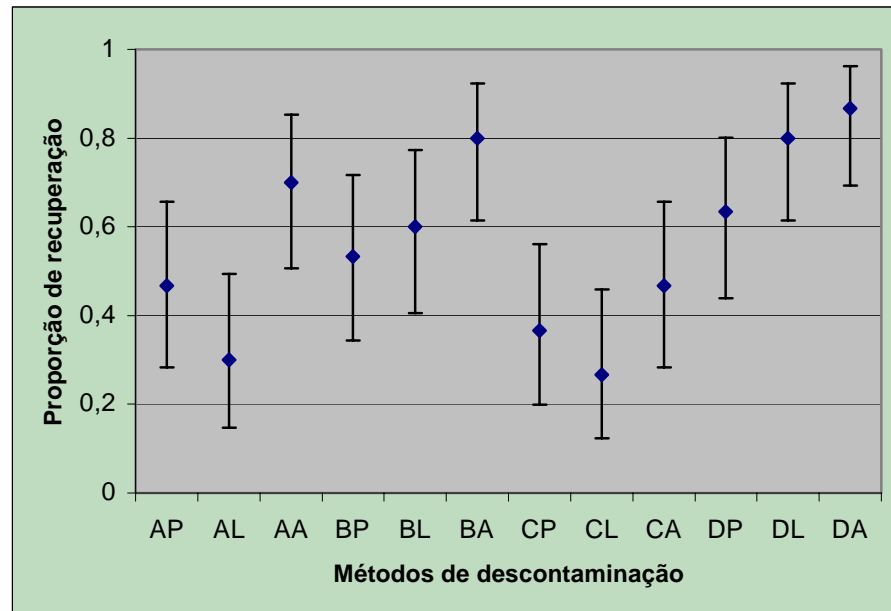
O pior protocolo foi o método básico com ressuspensão em solução de anfotericina B e semeadura em meio de Lowenstein-Jensen e o melhor foi o método ácido com ressuspensão em solução de anfotericina B e semeadura em meio de Lowenstein-Jensen com antibióticos. O melhor protocolo foi empregado na fase subsequente do presente projeto, qual seja, a caracterização dos períodos de eliminação fecal de *M. avium* em suínos experimentalmente infectados.

Tabela 1 – Eficiência de diferentes métodos de descontaminação visando o isolamento de *Mycobacterium avium* de fezes suínas – São Paulo – 2005

MÉTODOS MEIOS REPETIÇÕES	A						B						C						D					
	Petraghani		Lowenstein		Lowenstein + antibióticos		Petraghani		Lowenstein		Lowenstein + antibióticos		Petraghani		Lowenstein		Lowenstein + antibióticos		Petraghani		Lowenstein		Lowenstein + antibióticos	
1	+	+	+	+	+	+	C	+	C	C	C	+	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+
2	+	+	C	C	C	+	C	C	+	C	+	+	+	+	C	C	+	+	C	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	C	+	+	+	+	+	+	+	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	+	C	C	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+
5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	+	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
6	C	+	C	C	+	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	+	C	C	+	+	+
7	+	+	C	C	+	+	+	+	C	C	+	+	+	C	C	C	+	+	C	C	+	+	+	+
8	C	C	C	C	C	+	+	C	C	+	+	+	C	C	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	C	C	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	C	+	C	C	C	+	+	+	+	+	+	+
10	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+
11	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+
12	C	C	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	C	+	+	+	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+
14	C	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+
15	+	+	C	C	+	+	C	+	C	+	+	+	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+
16	C	C	C	C	+	+	C	C	+	+	+	+	+	+	C	C	+	+	+	+	+	+	+	+
17	C	C	C	C	+	+	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+
18	C	+	C	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	C	+	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C	C	C	C	C	C	C	+	C	+	C	+
21	+	+	C	C	+	+	+	+	+	+	+	+	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	C	+	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	C	C	+	+	+	+	+	+	+	+	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+
27	C	C	C	C	+	+	C	C	+	+	+	+	C	C	+	C	+	+	C	C	+	+	+	+
28	C	C	C	C	C	C	C	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C	C	C	+	+	+	C	+	C	C	C	C
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C	+	C	+	+	+	+
recuperados/ examinados	14/30		09/30		21/30		16/30		18/30		24/30		11/30		08/30		14/30		19/30		24/30		26/30	

Legenda: C : Presença de contaminação; +: Recuperação do inóculo

Figura 4 – Proporção de recuperação de *M. avium* a partir de fezes suínas, em 12 procedimentos testados – São Paulo – 2005



Legenda:

AP: Método básico com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Petragani;
AL: Método básico com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen;
AA: Método básico com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen com antibióticos;
BP: Método ácido com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Petragani;
BL: Método ácido com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen;
BA: Método ácido com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen com antibióticos;
CP: Método básico com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Petragani;
CL: Método básico com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Lowenstein-Jensen;
CA: Método básico com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen com antibióticos;
DP: Método ácido com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Petragani;
DL: Método ácido com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Lowenstein-Jensen;
DA: Método ácido com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Lowenstein-Jensen com antibióticos.

Tabela 2 - Valores de "p" resultantes das comparações dos métodos de descontaminação para recuperação de *Mycobacterium avium* a partir de fezes suínas (teste de comparação de duas proporções) - São Paulo - 2005

MÉTODOS	AP	AL	AA	BP	BL	BA	CP	CL	CA	DP	DL
AP											
AL	0,18										
AA	0,067	0,002									
BP	0,606	0,067	0,184								
BL	0,301	0,02	0,417	0,602							
BA	0,007	<0,001	0,371	0,028	0,091						
CP	0,432	0,584	0,01	0,194	0,071	0,001					
CL	0,108	0,774	0,001	0,035	0,009	<0,001	0,405				
CA	1	0,184	0,067	0,606	0,301	0,007	0,432	0,108			
DP	0,194	0,01	0,584	0,432	0,791	0,152	0,039	0,004	0,194		
DL	0,007	<0,001	0,371	0,028	0,091	1	0,001	<0,001	0,007	0,152	
DA	0,001	<0,001	0,117	0,005	0,02	0,488	<0,001	<0,001	0,001	0,037	0,488

Legenda:

AP: Método básico com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Petragani;
AL: Método básico com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen;
AA: Método básico com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen com antibióticos;
BP: Método ácido com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Petragani;
BL: Método ácido com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen;
BA: Método ácido com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen com antibióticos;
CP: Método básico com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Petragani;
CL: Método básico com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Lowenstein-Jensen;
CA: Método básico com ressuspensão em sol. sal. 0,85% estéril e semeados em meio Lowenstein-Jensen com antibióticos;
DP: Método ácido com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Petragani;
DL: Método ácido com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Lowenstein-Jensen;
DA: Método ácido com ressuspensão em anfotericina e semeados em meio Lowenstein-Jensen com antibióticos

3.2 EXPERIMENTO 2

Durante todo o experimento não houve mortalidade de animais inoculados e não foi isolado *M. avium* das fezes dos animais controles.

Em nenhum dos animais foi observada a presença de lesão granulomatosa macroscópica no momento da necrópsia.

Os resultados dos isolamentos de *M. avium* a partir de fezes de suínos em vários momentos pós inoculação oral, estão organizados na tabela 3. Para dar uma idéia gráfica desses resultados, foi elaborada a figura 5, para a qual o cálculo da média de UFC obedeceu o seguinte critério: escore 1=1 UFC, escore 2=11 UFC, escore 3=51 UFC e escore 4=100 UFC.

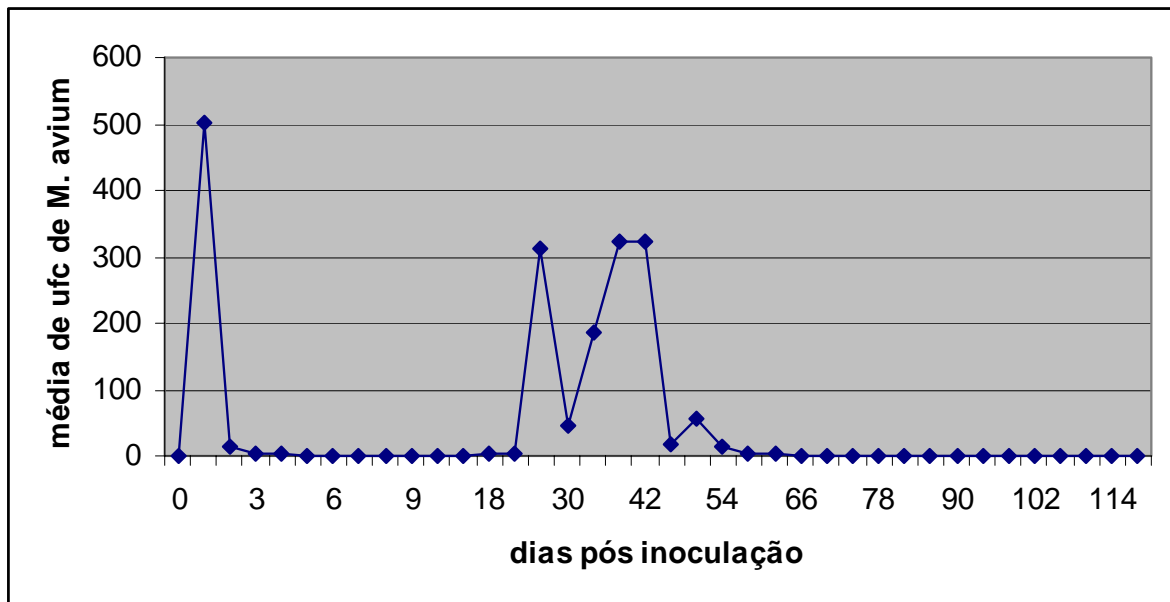


Figura 5 - Média de UFC de *Mycobacterium avium* eliminada pelas fezes de suínos experimentalmente infectados, segundo os dias pós inoculação - São Paulo - 2005

3.3 EXPERIMENTO 3

Em nenhum dos animais foi observada a presença de lesão granulomatosa macroscópica no momento da necrópsia.

Amostras de fezes foram coletadas do animal experimentalmente infectado para constatar sua condição de fonte de infecção. Os resultados constam da tabela 4.

Tabela 4 - Eliminação fecal de *M. avium* em suíno experimentalmente infectado com a estirpe PIG B, segundo os dias pós-inoculação- São Paulo - 2005

	dias pós-inoculação																											
	-6	-4	0	1	2	3	4	5	16	20	25	29	32	36	39	43	46	50	53	57	60	64	71	78	85	92	95	103
Isolamento	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+

Legenda:

+: positivo

-: negativo

Os animais contactantes foram alojados juntos com o infectado, quando decorridos 16 dias da infecção desse.

Os resultados do isolamento de micobactérias a partir das fezes dos contactantes constam da tabela 5 e os resultados do isolamento a partir de tonsilas, linfonodos, fígado e baço desses mesmos animais, após o sacrifício, estão organizados na tabela 6.

Tabela 5 - Isolamento de *M.avium* das fezes dos animais contactantes- São Paulo - 2005

Animais	dias pós-contato																					
	-6	-4	0	4	9	13	16	20	23	27	30	34	37	41	44	48	55	62	69	76	79	87
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	C	C	+
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	C	C	+
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

- : sem crescimento C: contaminado
 +: crescimento

Tabela 6 - Isolamento de *M.avium* dos órgãos dos animais contactantes - São Paulo - 2005

órgão animal	tonsilas	Linfonodos									baço	fígado
		1	2	3	4	5	6	7	ID	IG		
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

1:submandibular; 2: parotídeo; 3: mediastínico; 4: pancreático; 5: gástrico; 6: inguinal superficial; 7: cervical superficial; ID: intestino delgado; IG: intestino grosso

3.4 EXPERIMENTO 4

Para ilustrar o fluxo entre os compartimentos, foram feitas algumas simulações com base no sistema de equações (1), que estão mostradas na Figura 6. Os números iniciais de suscetíveis nas fases de maternidade, creche e terminação foram, respectivamente, 50, 100 e 200 suínos.

Com a introdução da doença infecciosa na granja, pode-se observar como variam os números de suscetíveis e infectados ao longo do tempo, em dias. Foram feitas simulações para diferentes valores de força de infecção ($\lambda = 0,001 \text{ ano}^{-1}$, $\lambda = 0,005 \text{ ano}^{-1}$ e $\lambda = 0,05 \text{ ano}^{-1}$). À medida que aumenta a força de infecção, também aumenta o número de infectados nas três fases, com a conseqüente redução no número de suscetíveis. Por outro lado, o tempo para atingir a situação de equilíbrio, a partir da condição inicial com toda a população suscetível, diminui com o aumento da força de infecção.

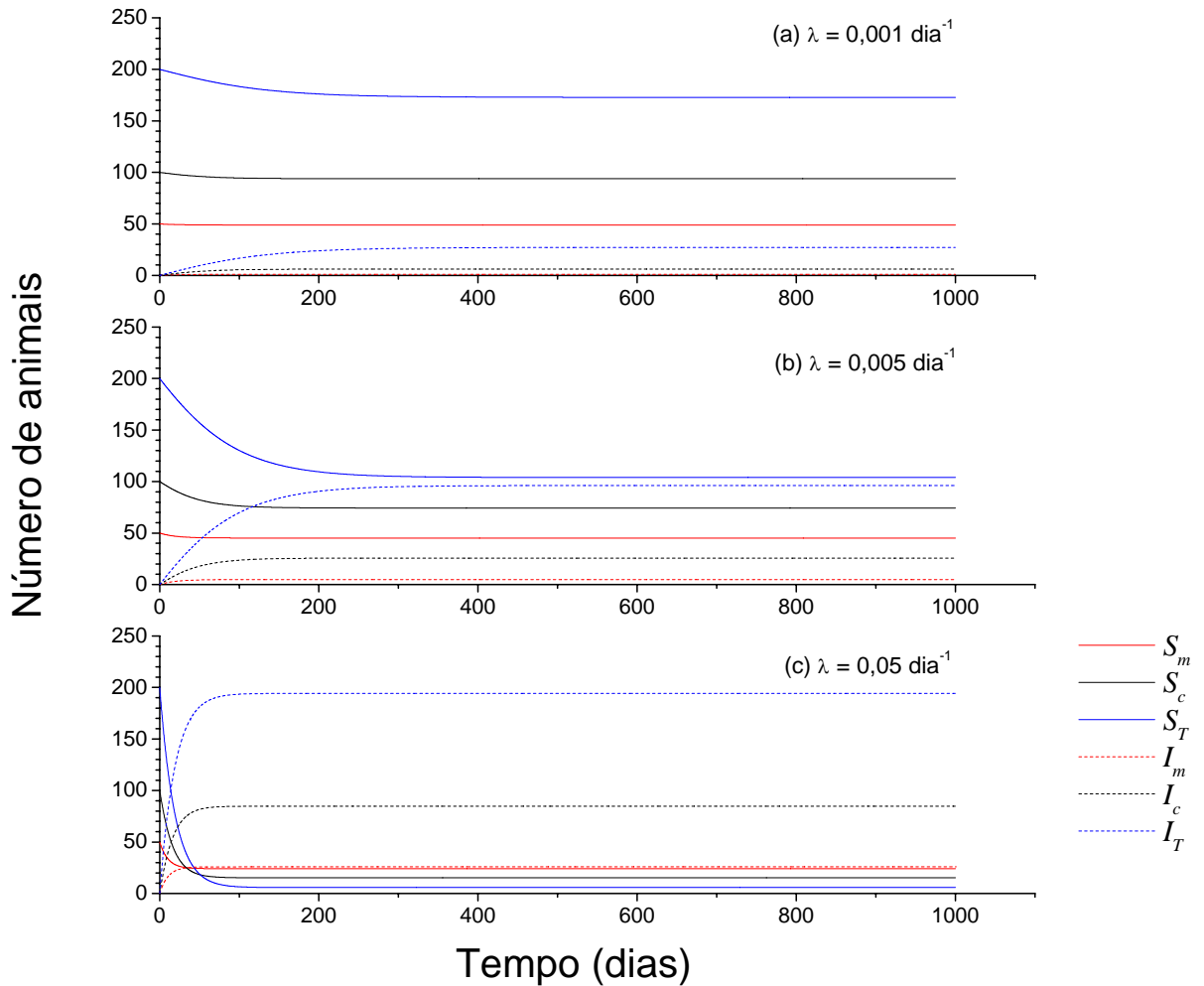


Figura 6 - Número de animais nos diversos compartimentos ao longo do tempo, para diferentes valores de força de infecção ((a) $\lambda = 0,001 \text{ ano}^{-1}$, (b) $\lambda = 0,005 \text{ ano}^{-1}$ e (c) $\lambda = 0,05 \text{ ano}^{-1}$). As linhas contínuas referem-se a suscetíveis e as linhas tracejadas a infectados. As curvas vermelhas, pretas e azuis referem-se, respectivamente, às fases de maternidade, creche e terminação – São Paulo - 2005

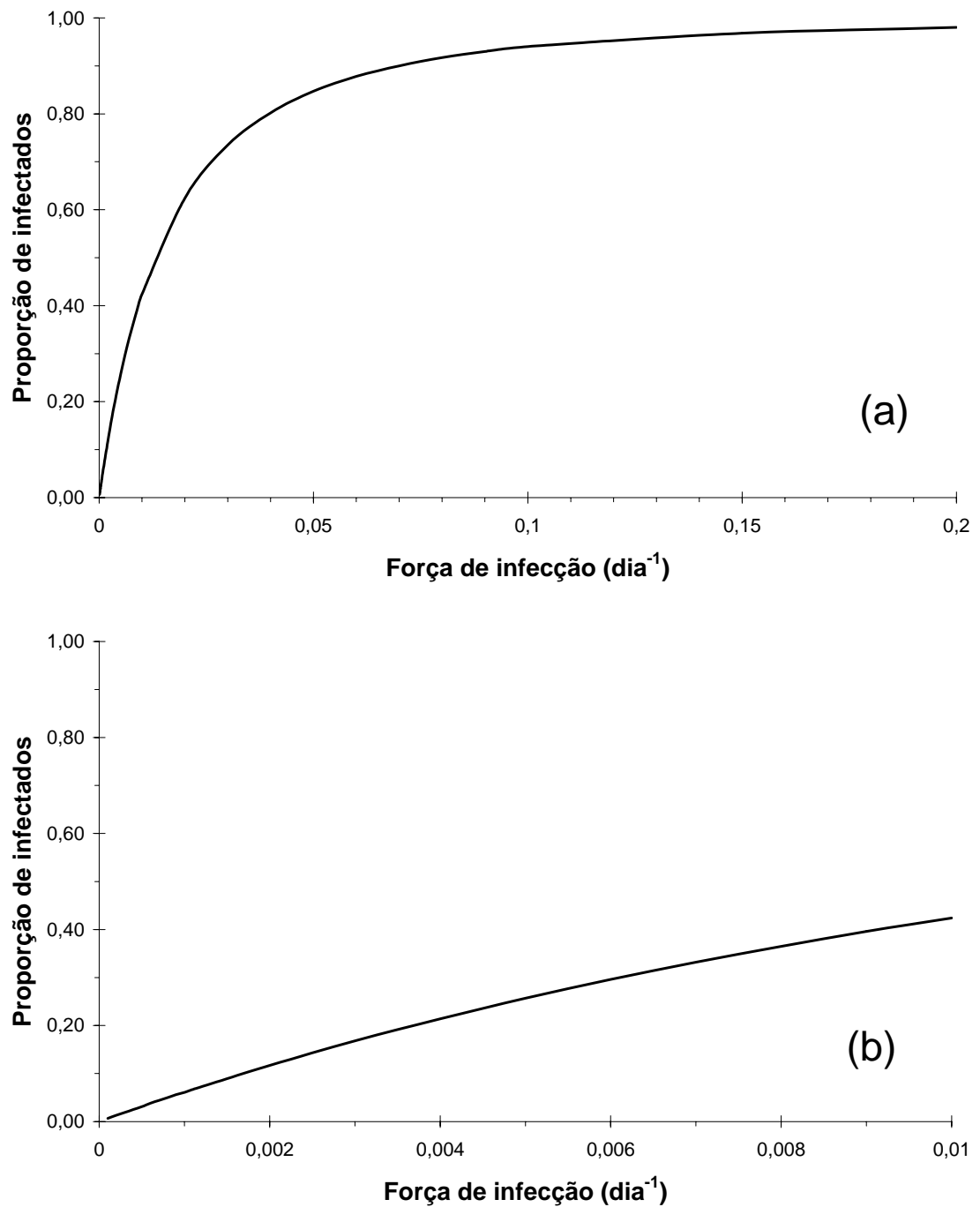


Figura 7 - Proporção de infectados no final da fase de creche, em função da força de infecção. Os gráficos (a) e (b) referem-se a diferentes intervalos de valores para a força de infecção - São Paulo - 2005

A figura 7 contém os resultados das simulações para a proporção de infectados no final da fase de creche para diferentes valores de força de infecção. Como mencionado em Material e Métodos, os animais que se infectarem até o final da fase de creche podem vir a apresentar lesões no momento do abate. Pode-se observar nesta figura que o aumento da força de infecção resulta em um aumento na proporção de infectados no final da fase de creche. Para valores de força de infecção acima de $0,02 \text{ dia}^{-1}$ (Gráfico a), pode-se notar um desvio em relação a um comportamento linear. Assim, para que haja um acréscimo na proporção de infectados, quando esta apresenta um valor elevado, é necessário um aumento na força de infecção proporcionalmente superior ao que seria necessário em uma condição de baixa proporção de infectados.

A figura 8 apresenta os resultados das simulações para a proporção de infectados no final da fase de creche, em função do tempo em dias. Cada curva nesta figura corresponde a um valor diferente de força de infecção. Pode-se observar que, para um dado valor de força de infecção, a proporção de infectados estabiliza em um valor constante. Nesta situação, esperaríamos que a proporção de animais com lesões no momento do abate se mantivesse constante no decorrer do ano. Também se nota o comportamento não-linear comentado no parágrafo anterior.

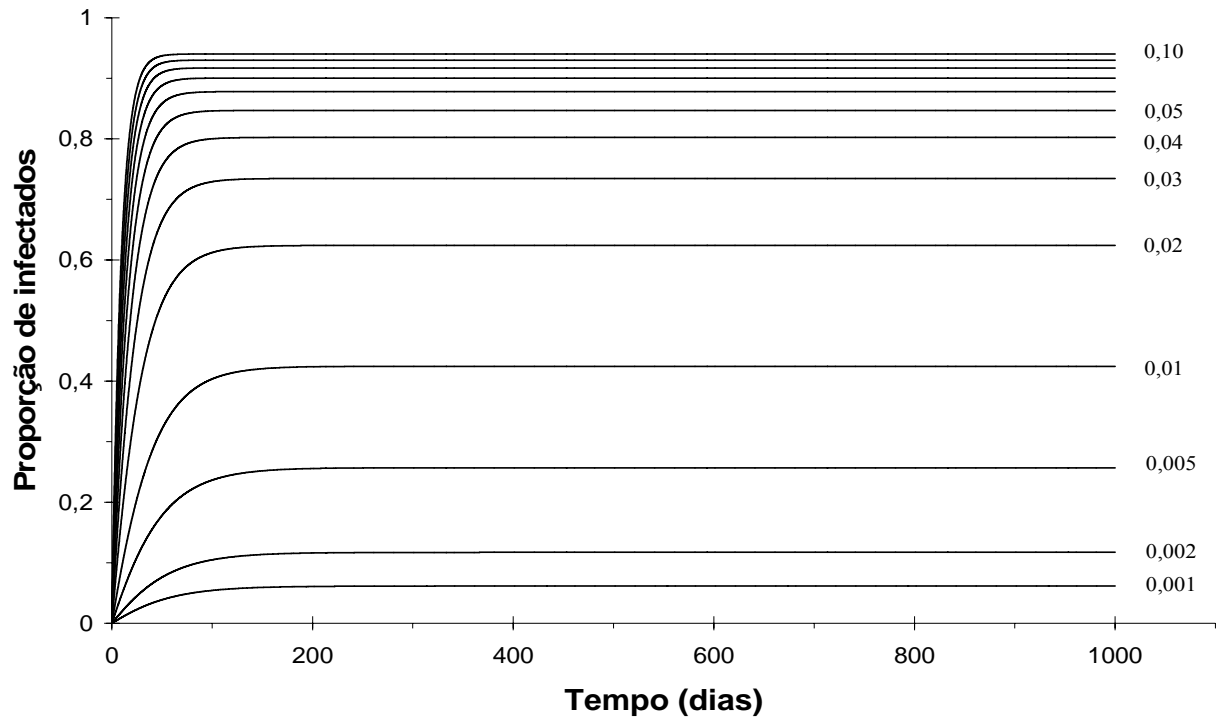


Figura 8 - Proporção de infectados no final da fase de creche, em função do tempo em dias. Cada curva corresponde a um valor de força de infecção, indicado (em dia^{-1}) ao lado da respectiva curva. As curvas com λ entre $0,05 \text{ dia}^{-1}$ e $0,10 \text{ dia}^{-1}$ correspondem a valores de força de infecção de $0,06$, $0,07$, $0,08$ e $0,09 \text{ dia}^{-1}$, de baixo para cima - São Paulo - 2005

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1

Os cultivos oriundos das amostras de fezes, quando realizados sem a prévia descontaminação, contaminaram-se nos primeiros 4 dias de incubação. Isso significa que o método de descontaminação é imprescindível ao isolamento de micobactérias de fezes suínas e sugere que a carga de contaminantes das amostras tratadas é bastante elevada.

O inóculo apresentou crescimento de colônias confluentes nos três meios de cultura utilizados, sugerindo que a adição de antibiótico no meio de Lowenstein-Jensen não prejudicou o crescimento de *Mycobacterium avium*.

O pior protocolo foi o método básico com ressuspensão em solução de anfotericina e semeadura em meio de Lowenstein-Jensen (recuperação de 27%).

Embora a análise estatística tenha mostrado que o método DA não recuperou mais micobactérias que os métodos AA, BA e DL (Tabela 4), os dados brutos apontaram um percentual maior de recuperação para este método (87%). Por esta razão, tal método foi empregado na fase

subseqüente do presente projeto, qual seja, a caracterização dos períodos de eliminação fecal de *M. avium* em suínos experimentalmente infectados.

Balian et al. (2002) comparou dois métodos para descontaminação de fezes de hamsters experimentalmente infectados com *M. avium* - método de Petroff (NaOH 4%) e método de Lowenstein-Jensen modificado (H₂SO₄ 4%) - mas, embora tenham verificado concordância moderada entre eles, observaram percentuais de sucesso no isolamento de 32% e 29%, respectivamente e percentuais de contaminação de 17% e 26%. Os autores sugeriram que concentrações maiores de H₂SO₄ poderiam reduzir a freqüência de contaminações e, conseqüentemente, aumentar a de sucessos no isolamento. No presente estudo, a concentração de H₂SO₄ foi de 12%, três vezes superior à utilizada por Balian et al. (2002), o que resultou em menor freqüência de contaminação (12/30, Tabela 1) e conseqüente maior freqüência de recuperação do agente (18/30 , Tabela 1).

Silva et al. (2000) utilizaram dois métodos para descontaminação de fezes de suínos experimentalmente infectados com MAC - método de Petroff (NaOH 4%) e método de descontaminação com ácido oxálico a 5%. Os autores relataram que o isolamento de micobactérias das fezes não foi satisfatório, pois houve alto nível de contaminações fúngicas e bacterianas dos cultivos para ambos os métodos de descontaminação. Face esses resultados obtidos com o método de Petroff (NaOH 4%), no presente experimento optou-se por incluir duas variações aos métodos de

descontaminação testados, quais sejam, adição de antibióticos no meio de Lowenstein Jensen e substituição da solução salina utilizada na ressuspensão do sedimento por solução contendo anti-micótico.

Como resultado, obteve-se que o melhor procedimento de descontaminação, ou seja, aquele que permitiu a maior frequência de sucessos no isolamento 87% (Tabela 1) foi a descontaminação com H₂SO₄ a 12%, seguida de ressuspensão com o anti-micótico e semeadura em meio de Lowenstein-Jensen com antibióticos.

4.2 EXPERIMENTO 2

As micobactérias eliminadas no primeiro período (do 1º ao 4º dia pós-inoculação), provavelmente resultaram da eliminação passiva do inóculo. A segunda fase de eliminação (com início no 18º e término no 62º dias pós-inoculação), provavelmente advieram de uma lesão aberta ou ativa de parede intestinal. O não isolamento de micobactérias, em nenhuma oportunidade, a partir do 66º dia pós-inoculação, sugere que a partir desse momento as lesões intestinais resolveram-se e deixaram de lançar o agente para a luz do órgão. Esses resultados são corroborados por Ellsworth et al. (1980) e Pavlas, (1987) que, em estudos semelhantes, nos quais infectaram oralmente

suínos com MAC, verificaram um período inicial (passivo) de eliminação entre o 1º e 9º e um segundo (ativo) entre o 20º e 90º dias pós-inoculação. Ressalte-se que estes autores pesquisaram a eliminação fecal de MAC até 69 e 116 dias pós-inoculação, respectivamente. Resultados semelhantes quanto aos dois períodos de eliminação (ativo e passivo) também foram obtidos por Balian, (1999) utilizando como modelo biológico o hamster (*Mesocricetus auratus*) inoculados oralmente com MAC. Este autor verificou que a eliminação passiva em hamsters se estendeu até o 8º dia pós-inoculação e a ativa iniciou-se aos 10º e perdurou até o 105º dia pós-inoculação.

4.3 EXPERIMENTO 3

O animal experimentalmente infectado eliminou micobactérias pelas fezes até o 103 dia pós-inoculação, o que leva a supor que tenha ocorrido ou uma prolongação do período de eliminação ou que este animal tenha se reinfectado.

Ellsworth et al., (1980), estudando a eliminação fecal de MAC em suínos experimentalmente infectados, referiram que "as lesões em tonsilas e intestino são significativas fontes de *M.avium* nas fezes em animais artificialmente infectados".

O isolamento de micobactérias a partir das fezes e/ou das tonsilas de cinco dos sete animais contactantes permitiu afirmar que houve transmissão horizontal entre o animal infectado e os contactantes. Resultados semelhantes também foram relatados por Acland e Whitlock, (1986) e Silva et al., (2000). Acland e Whitlock, (1986) observaram lesões microscópicas em dois de 34 suínos mantidos em contato com outros 30 inoculados com *M. avium* sorotipo 4. Os animais foram colocados em contato na quarta semana pós-inoculação. Silva et al., (2000) utilizando três estirpes de *Mycobacterium avium-intracellulare* (VPS1, SC1 e ATCC – 13950) observaram a ocorrência da transmissão entre os suínos mantidos na mesma baia, com as três estirpes utilizadas. No estudo de Silva et al., (2000) os animais contactantes foram colocados em contato com o infectado no dia da inoculação, portanto na fase passiva de eliminação do inóculo, ou seja os contactantes provavelmente infectaram-se com o inóculo eliminado pelas fezes e não com micobactérias advindas de lesões abertas ou ativa de parede intestinal. Para contornar este problema, no presente estudo os animais contactantes foram colocados em contato com o infectado no início da fase ativa de eliminação.

4.4 EXPERIMENTO 4

Como se pode observar nas simulações realizadas, para uma dada força de infecção, a proporção de infectados no final da fase de creche – aqueles que apresentariam lesões no abate – se mantém constante ao longo do tempo, não estando sujeita a variações de carácter sazonal. Seria razoável esperar um resultado deste tipo, uma vez que, para uma taxa de infecção fixa ao longo do tempo, esperaríamos uma taxa de contatos potencialmente infectantes (β) também constante. Como exposto acima, pode-se entender β como a composição de dois fatores:

$$\beta = \beta_{\text{cont}} \beta_{\text{inf}} .$$

O primeiro fator está relacionado à estrutura de contatos existente entre os animais na propriedade. Considerando que o número (e também a densidade) de animais se mantenha constante ao longo do ano, seria de se esperar que esse fator, β_{cont} , também se mantivesse constante. No presente trabalho, não consideramos variações no segundo fator, β_{inf} , supondo que a probabilidade de haver infecção, caso haja um contato potencialmente infectante, também se mantivesse constante ao longo do ano.

Ora, o que se observa em muitas granjas é que a proporção de lesões detectadas por ocasião do abate varia ao longo do ano e, em alguns casos, de modo significativo, passando de valores em torno de 1% a valores

superiores a 10% em épocas distintas. Portanto, os pressupostos do modelo quanto à força de infecção constante ao longo do ano não se aplicam nesses casos.

Se analisarmos novamente a expressão anterior, notaremos que o primeiro dos dois fatores, β_{cont} , deve se alterar pouco ao longo do ano, uma vez que depende de fatores como densidade e número de animais nas baias, e estamos supondo que esses números não se alteram significativamente. Por conseguinte, uma hipótese que pode ser levantada para explicar a variação sazonal na proporção de lesões observadas (MARTINS, 2001) é a de que o segundo fator, β_{inf} , relacionado ao agente, possa variar ao longo do tempo, uma vez que características como infectividade e virulência podem ser influenciadas por fatores ambientais sazonais, como temperatura e umidade. Isso explicaria a variação sazonal observada em levantamentos a campo.

Assim, levando em conta apenas a estrutura de contatos existente em granjas, sem influência de fatores ambientais, esperaríamos um padrão constante de lesões observadas em abatedouros ao longo do tempo, de acordo com as simulações realizadas. Variações sazonais, se ocorrem, devem ser influenciadas por fatores outros, provavelmente de origem ambiental.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

5.1 EXPERIMENTO 1

O método ácido com ressuspensão em solução de anfotericina B e semeadura em meio de Lowenstein-Jensen com antibióticos, apresentou o maior percentual de recuperação de micobactérias a partir das fezes de suínos (87%).

5.2 EXPERIMENTO 2

Suínos inoculados oralmente com *Mycobacterium avium*, estirpe PIG-B, apresentam duas fases distintas de eliminação fecal do agente: uma primeira, do 1º ao 4º e uma segunda, com início no 18º e término no 62º dias pós-inoculação. Esses animais não voltaram a eliminar o agente até 118 dias pós-inoculação.

5.3 EXPERIMENTO 3

Cinco, dos sete animais contactantes, infectaram-se com o *M. avium*, estirpe PIG B.

5.4 EXPERIMENTO 4

A simulação matemática da doença, considerando a transmissão horizontal como mecanismo principal da ocorrência de condenações em matadouro por linfadenite granulomatosa é inconsistente com o que se observa na população. Portanto, o componente ambiental tem papel preponderante na dinâmica das infecções micobacterianas dos suínos produzidos no Brasil.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

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

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

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

BALIAN, S. C.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; MORAIS, Z, M. FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 69, n. 2, p. 11-14, 2002.

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

BARTLETT, M. S. **Stochastic population models**. London: Spottiswoode, Ballantyne, 1960. 90 p.

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

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

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

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

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. **Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal**. Ramos Mejia, Buenos Aires: 1979. 63p. (Serie de monografias científicas y técnicas, C.P.Z., 11).

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. **Métodos de laboratorio de microbiologia veterinária para el aislamiento e identificación de micobacterias**. Ramos Mejia, Buenos Aires: 1973. 60p. (Serie de Monografias Científicas y Técnicas, C.P.Z., 6).

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

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

CORNER, L. A.; TRAJSTMAN, A. C.; LUND, K. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*, **New Zealand Veterinary Journal**, v. 43, p. 129-133, 1995.

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

DAVID, H.; BRUM, L.; PRIETO, E. Manual de micobacteriologia em Saúde Pública. Princípios e métodos. Lisboa: **Instituto de Higiene e Medicina Tropical**, 1994.

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

ELLSWORTH, S.; KIRKBRIDE, C. A.; DARREL, D. J. Excretion of *Mycobacterium avium* from lesions in the intestine and tonsils of infected swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 9, p. 1526-1530, 1980.

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

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

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

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: FNS, 1994.

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

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

GRENFFELL, B. T.; DOBSON, A. P. **Ecology of infectious diseases in natural populations**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 521 p.

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

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

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

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

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

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

MASSAD, E.; MENEZES, R. X.; SILVEIRA, P. S. P.; ORTEGA, N. R. S. O. **Métodos Quantitativos em Medicina**. São Paulo: Manole, 2004. 561 p.
MEISSNER, G.; VIALIER, J.; COULLIoud, D. Identification serologique de 1.590 souches de *Mycobacterium avium* isolees en France et en Allemagne Federale. **Annual Microbiology**, v. 129A, p. 131-137, 1978.

MORÉS, N.; SILVA, V. S.; VENTURA, L. V. Linfadenite granulomatosa em suínos causada por micobactérias atípicas. **Embrapa suínos e aves**. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2001/artigo-2001-n008.html>>. Acesso em 20 jul. 2004.

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

O. DIEKNANN, J. A. HEESTERBEEK. **Mathematical Epidemiology of Infectious Diseases. Model building, Analysis and Interpretation**. London: Other Wiley editorial Officer, 2000. 303 p.

OLIVEIRA, E. M. D.; MORAIS, Z. M.; TABATA, R.; DIAS, R. A.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; MORÉS, N.; GUERRA, J. L.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; BALIAN, S. C.; FERREIRA NETO, J. S. Avaliação da virulência de estirpes de *Mycobacterium avium* presentes na população de suínos no sul do Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, n. 4, p. 202-207, 2002.

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

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, 365p.

PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; FERREIRA NETO, J. S.; MORAIS, Z. M. Influência da matéria orgânica na atividade micobactericida de cinco desinfetantes de uso pecuário. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 51-60, 1992.

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

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

REIS, R. Controle da tuberculose em alguns países. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 17, p. 45-56, 1965.

REZNIKOV, M.; LEGGO, J. H.; TUFFLEY, R. E. Further investigation of na outbreak of mycobacterial lymphadenitis at a deep-litter piggery. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 12, p. 622-623, 1971.

REZNIKOV, M.; STRANGER, R. S.; LEGGO, J. H.; YOUNG, A. V. Mycobacterial lymphadenitis in pigs on the darking downs. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, n. 5, p. 264-265, 1973.

ROMÁN, M. C. **Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias (tuberculosis, lepra e micobacteriosis)**. Universidade de Cordoba – Facultad de Medicina, Espanha. 1990, p. 29-30.

SHINNICK, T. M.; GOOD, R. C. Mycobacterial taxonomy. **Journal clinical Microbiology**, v. 13, p. 884-901, 1994.

SILVA, V. S.; MORÉS, N.; DUTRA, V. D.; FERREIRA NETO, J. S.; SAAD, M. H. F. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/cgi-bin/fppe/fbtext?got=last&pid=S0102-09352000000600002&lng>. Acesso: 20 de maio de 2000.

SONGER, J. G.; BICKNELL, E. J.; THOEN, C. O. Epidemiological Investigation of Swine Tuberculosis in Arizona. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v. 44, n. 1. p. 115-120, 1980.

SZABO, I.; TUBOLY, S.; SZEKY, A.; KEREKES, J.; UDVARDY, N. Swine lymphadenitis due to *Mycobacterium avium* and atypical mycobacteria. II Studies on the role of littering in mycobacterial lymphadenitis incidence in large-scale pig units. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungariae**, v. 25, p. 77-83, 1975.

SZAZADOS, I. Az atípuzos mycobacteriumkkal (*Mycobacterium avium*) fertőzöttsertéshús fogyasztásának egészségügyi kockázatáról. [Health hazards of pig meat with atypical mycobacterial infection (*Mycobacterium avium*)]. **Magyar – Állatorvosok – lapja**, v. 48, n. 3, p. 170-171, 1993.

TAMMEMAGI, L.; SIMMONS, G. C. Pathogenicity of *Mycobacterium intracellulare* to pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 7, p. 337-339, 1971.

TAPARELLI, F.; MARZADORI, F. Observations on two outbreaks of tuberculosis in pigs diagnosed at slaughter. **Selezione Veterinaria**, v. 31, n. 9, p. 1133-1135, 1990.

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

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

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

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

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