

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

LINFADENITE SUÍNA

**DISCUSSÃO DOS NOVOS MÉTODOS DE INSPEÇÃO SANITÁRIA
PRECONIZADOS PELA AUTORIDADE EUROPEIA DE SEGURANÇA
ALIMENTAR**

Ana Cláudia Carvalho Gonçalves

Orientador(es)

Eduarda Maria Freitas Gomes da Silva Neves

Co-Orientador(es)

Anabela Antunes Costa

Porto 2014

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

LINFADENITE SUÍNA

**DISCUSSÃO DOS NOVOS MÉTODOS DE INSPEÇÃO SANITÁRIA
PRECONIZADOS PELA AUTORIDADE EUROPEIA DE SEGURANÇA
ALIMENTAR**

Ana Cláudia Carvalho Gonçalves

Orientador(es)

Eduarda Maria Freitas Gomes da Silva Neves

Co-Orientador(es)

Anabela Antunes Costa

Porto 2014

Resumo:

A atuação do Médico Veterinário Oficial (MVO) estende-se desde a produção, ao transporte de animais, ao abate, ao exame em vida e após a morte, à inspeção sanitária nas lotas após a captura do pescado, à transformação industrial, seguindo uma multiplicidade de processamentos, ao armazenamento e à colocação no mercado.

Este relatório descreve todo o trabalho realizado e a experiência e conhecimentos adquiridos, no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV), que decorreu de 16 de setembro de 2013 a 6 de janeiro de 2014, sob a co-orientação e acompanhamento da Dra. Anabela Costa, da Divisão de Alimentação e Veterinária de Aveiro (DAVA), e sob orientação da Professora Eduarda Gomes Neves, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto.

Este estágio teve como objetivo principal uma abordagem direta e concreta do que é e como atua a Inspeção Sanitária em Portugal preparando-me, assim, com os conhecimentos necessários para um possível futuro desempenho de funções nesta área. Neste contexto, foi-me possibilitado o acompanhamento de vários MVO, no exercício das suas múltiplas funções na lota e em vários estabelecimentos de abate da região de Aveiro, bem como o acompanhamento dos mesmos aquando da realização das tarefas de auditoria.

No decurso do estágio e durante a inspeção *post mortem* de suínos, no Matadouro da Beira Litoral (MBL), foi registado um elevado número de lesões ganglionares granulomatosas, motivando o desenvolvimento de um trabalho laboratorial, o qual dá corpo à segunda parte do relatório, onde se procurou determinar se o agente etiológico envolvido pertence ao Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), e qual a subespécie presente nas amostras recolhidas, mediante exame cultural, exame direto e métodos de biologia molecular.

A terceira parte deste trabalho centrou-se na discussão das eventuais implicações na deteção do agente microbiano *Mycobacterium* spp., que possam surgir aquando da aplicação dos novos métodos de inspeção em suínos (apenas visual), preconizados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA).

Agradecimentos:

O espaço limitado desta seção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia e queria, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Medicina Veterinária, me ajudaram a cumprir os meus objetivos e a concretizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas com um profundo sentimento de agradecimento:

À Professora Eduarda Gomes Neves, minha orientadora e grande responsável pelo meu estágio na área da Inspeção Sanitária, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer saber mais e a vontade de querer fazer melhor. Agradeço, também, a oportunidade que me deu de me integrar no trabalho de investigação já em curso, e reconheço com gratidão não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases deste trabalho.

À Dra. Anabela Costa, minha co-orientadora, o meu sincero agradecimento pela orientação dada neste estágio. Muito obrigada pelo profissionalismo, pela sincera amizade e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo. A sua boa disposição naquelas madrugadas de abate será uma constante para mim.

Ao INSA, e em especial à Dra. Anabela Silva e à Dra. Cristina Ferro, estou grata por me terem proporcionado as condições necessárias para a elaboração de uma parte fundamental do meu trabalho e por permitirem a minha integração num centro de investigação de tão elevada qualidade e exigência. Agradeço a simpatia e disponibilidade demonstrada.

Ao Corpo de Inspeção do Matadouro da Beira Litoral S.A., nomeadamente à Dra. Ana Neves, Dr. Pedro Lopes, Dra. Joana Vaz, Eng.^a Graça Amaral, Eng.^o Luzio e Eng.^o Álvaro, com quem tive o privilégio de trabalhar, agradeço todo o apoio, ensinamento, amizade e simpatia demonstrada.

Aos Médicos Veterinários e Auxiliares Oficiais acompanhados nos restantes estabelecimentos, nomeadamente ao Dr. André, Dra. Dora, Dr. João, Dra. Margarida, Dr. Juan, Dra. Elisabete, Dr. Rui, Dra. Maria, Eng.^a Laura, Eng.^o Pedro e Eng.^o Gama, agradeço toda a disponibilidade, ajuda e incentivo que me deram.

Aos funcionários das diferentes Unidades de Abate, em especial aos do Matadouro da Beira Litoral S.A., agradeço a amizade e a boa disposição em todos os momentos.

Aos meus amigos, em especial à Andreia Alves, agradeço a partilha de todos os bons (e menos bons) momentos ao longo destes 18 anos de convivência.

Aos meus colegas de curso (em especial aos mais importantes) um muito obrigado pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, que permitiram que encarasse cada dia com particular motivação.

Ao Jorge, um agradecimento especial pelo apoio e carinho, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Por tudo, a minha enorme gratidão!

À minha família, em especial à minha mãe, ao meu irmão e à minha avó, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

À minha estrelinha da sorte, que me viu crescer, me levava à escola e fez de mim a pessoa que em parte sou hoje, um beijo carregado de saudade!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

(Leonardo da Vinci)

Lista de Abreviaturas

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes

CC – Controlo do Conjugado

CE – Comissão Europeia

DAV – Divisão de Alimentação e Veterinária

DAVA – Divisão de Alimentação e Veterinária de Aveiro

DDO – Doença de Declaração Obrigatória

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, do inglês “European Food Safety Authority”

GC – Controlo do Género

G.l – Gânglio linfático

HACCP – do inglês “Hazard Analysis and Critical Control Points”

ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

INIAV – Laboratório Veterinário de Referência

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IRCA – Informações sobre a cadeia alimentar

IS – Sequência de inserção, do inglês “Insertion Sequence”

LJ – Löwenstein Jensen

LTS – Linfadenite Tuberculosa Suína

M. – *Mycobacterium*

MAC – Complexo *Mycobacterium avium*, do inglês “*Mycobacterium Avium Complex*”

Mah - *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

MBL – Matadouro da Beira Litoral

MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

MTC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

MVO – Médico Veterinário Oficial

MNT – Micobactérias Não Tuberculosas

PACE – Plano de Aprovação e Controlo dos Estabelecimentos

Pb – Pares de bases

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia, do inglês “Polymerase Chain Reaction”

PIGA – Plano de Inspeção dos Géneros Alimentícios

PNCR – Plano Nacional de Controlo de Resíduos

RFLP – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição, do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

UC – Controlo Universal

µl – microlitros

UE – União Europeia

ZN – Ziehl-Neelsen

Índice

1. Atividades desenvolvidas em Inspeção Sanitária.....	1
2. Linfadenite Suína.....	2
2.1 Introdução	2
2.1.1 Género <i>Mycobacterium</i> – Complexo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC) - <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (Mah)	3
2.2 Material e Métodos	5
2.2.1 Recolha de amostras e dados.....	5
2.3 Técnicas de diagnóstico	7
2.3.1 Exame direto.....	7
2.3.2 Exame cultural.....	8
2.3.3 Métodos Moleculares	8
2.3.3.1 Extração de DNA.....	8
2.3.3.2 Teste GenoType <i>Mycobacterium</i> CM	8
2.3.3.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) “multiplex”	9
2.3.3.3.1 Amplificação	9
2.3.3.3.2 Eletroforese	10
2.4 Resultados.....	10
2.5 Discussão	11
3. Discussão do efeito das alterações propostas, pela EFSA, no atual método de inspeção de suínos e na consequente deteção do agente <i>Mycobacterium</i> spp.	12
3.1 Avaliação do risco	13
3.1.1 Identificação do perigo.....	14
3.1.2 Caracterização do perigo.....	14
3.1.3 Avaliação da exposição.....	16
3.1.4 Caracterização do risco	16
3.2 Fonte de atribuição.....	17
3.3 Alterações propostas ao atual sistema de inspeção sanitária em Suínos	18

3.3.1 Inspeção <i>Ante Mortem</i>	18
3.3.1.1 IRCA.....	19
3.3.2 Inspeção <i>Post Mortem</i>	20
3.4 Riscos emergentes ou re-emergentes	23
3.5 Comparação do método atual e do método proposto de inspeção sanitária, em suínos	25
Conclusão e perspetivas futuras	26
Referências bibliográficas	29
Anexo I. Comunicação de uma DDO	31
Anexo II. Técnicas de descontaminação e homogeneização.....	32
Anexo III. Extração de DNA e Amplificação – teste GenoType Mycobacterium CM.....	33
Anexo III. Amplificação – teste GenoType Mycobacterium CM.....	34
Anexo III. Hibridização – teste GenoType Mycobacterium CM	35
Anexo III. Tabela de Interpretação – teste GenoType Mycobacterium CM.....	36
Anexo IV. IRCA de uma exploração com casos antecedentes de LTS.....	37
Anexo V. Número de animais abatidos e de animais suspeitos de infeção por <i>M.avium</i> spp. em 2012, em Portugal.....	38

1. Atividades desenvolvidas em Inspeção Sanitária

É definido como “Controlo Oficial” qualquer forma de controlo efetuado pela Autoridade Competente para verificar o cumprimento da legislação alimentar, incluindo as normas de saúde animal e de bem estar dos animais (Regulamento CE nº 854/2004). A “Autoridade Competente”, em Portugal, é a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Compete então à Inspeção Sanitária, efetuada pela DGAV, e que é levada a cabo por Médicos Veterinários Oficiais, a avaliação da sanidade, as práticas de alimentação, a informação relativa à administração de fármacos ou vacinas, o controlo da identificação e do bem estar de animais destinados à produção de géneros alimentícios, bem como a verificação de condições de laboração dos estabelecimentos do setor alimentar onde ocorre essa produção. Essa verificação inclui os sistemas de produção e respetivos fluxogramas, processos de transformação, as condições ambientais e de trabalho, gestão de efluentes e subprodutos, origem das matérias-primas e do destino dos produtos finais, a fim de avaliar o cumprimento dos requisitos legais em todos os casos. Além dos atos inspetivos que o MVO realiza no matadouro, compete-lhe, ainda, a realização de tarefas no âmbito do Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR), do Plano de Inspeção dos Géneros Alimentícios (PIGA) e do Plano de Aprovação e Controlo dos Estabelecimentos (PACE).

Durante o período de estágio na Divisão de Alimentação e Veterinária (DAV) de Aveiro, foram realizadas e acompanhadas as colheitas de amostras, no âmbito do PNCR, não só nos diferentes estabelecimentos de abate como, também, na truticultura “Trutiserra Produção e Comércio, LDA” e na piscicultura “Piscicultura das Quintas do Norte – Aquacria Piscículas, LDA”. No âmbito do PACE, foram realizadas e acompanhadas vistorias aos estabelecimentos de transformação de géneros alimentícios “Sabor a Kilo – Produtos Alimentares, LDA” e “Irmãos Monteiro, S.A.”, aos entrepostos “ETS-Vitor Mariano Import, Export, LDA” e “Segredos Ibéricos – Comércio e Distribuição de Produtos Alimentares, LDA”, ao assador “Lopes dos Leitões – António Lopes Silva”, bem como à Cozinha das instalações da Câmara Municipal de Ílhavo. Ainda, durante o tempo de estágio, tive o privilégio de assistir à auditoria realizada no estabelecimento de abate e transformação, de suínos e leitões, “Salsicharia Ideal Oliveirense, LDA”, no âmbito do Bem-Estar Animal, pelo Gabinete de Auditorias (DGAV), de Lisboa.

O acompanhamento da inspeção sanitária decorreu em vários centros de abate, inseridos na área geográfica da DAV de Aveiro, designados como “Matadouro da Beira Litoral, S.A.” (abate de suínos, leitões, bovinos, caprinos e ovinos), na zona industrial da Taboeira, “Restaurante Abílio Marques” (abate de leitões), em Bom Sucesso, “Salsicharia Ideal Oliveirense, LDA” (abate de

suínos e leitões), em Oliveira do Bairro, “Restaurante Vidal Ferreira” (abate de leitões), em Águeda, centro de abate de coelhos “Joaquim Jesus Ramos”, em Estarreja, centro de abate de aves “Hilário Santos & Filhos” em Pardilhó e Lota de Aveiro.

2. Linfadenite Suína

2.1 Introdução

O sistema linfático, particularmente ao nível dos gânglios, pode apresentar alterações diversas que são, em última análise, a resposta definitiva dos órgãos às agressões. É na criteriosa interpretação destas alterações que o MVO se deve apoiar para decidir sobre qual o destino das carnes e dos subprodutos (Gil 2005).

Durante o período de estágio, contabilizou-se um elevado número de lesões ganglionares granulomatosas, sempre que a inspeção *post mortem* das carcaças de suínos era levada a cabo. Este tipo de lesões é compatível com diversos agentes etiológicos, alguns deles com impacto zoonótico, tais como o *Mycobacterium* spp., o *Rhodococcus equi*, o *Staphylococcus* sp., o *Streptococcus* sp. e a *Enterobacteriaceae* (Alban *et al.* 2008; Lara *et al.* 2011; Eisenberg *et al.* 2012).

Os critérios de decisão sanitária a aplicar no caso da presença de lesões ganglionares granulomatosas, compatíveis por *Mycobacterium avium* spp. em suínos, são os indicados na Circular nº 232/G de 2005, ou seja, o MVO deve reprovar a cabeça se observar lesões apenas ao nível dos gânglios linfáticos (g.l.) mandibulares e deve reprovar as vísceras brancas se observar lesões apenas ao nível dos gânglios mesentéricos, aprovando o resto da carcaça. Contudo, se as alterações ao nível dos g.l. forem extensas abrangendo regiões anatómicas diferentes, se afetarem outros órgãos, ou se surgirem em g.l. de animais muito jovens, então a carcaça e respetivas vísceras devem ser totalmente rejeitados. Quanto ao Regulamento CE n.º 854/2004, este apenas refere os critérios de decisão sanitária relativos à tuberculose.

Esta elevada ocorrência de lesões motivou a colheita de amostras e associação a um trabalho laboratorial já em curso (Enguião 2013), com o objetivo de determinar se o agente etiológico envolvido pertence ao Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) e, neste caso, qual a subespécie envolvida. A identificação do agente causal é preconizada sempre que se identificam estas lesões e se fazem as respetivas rejeições parciais ou totais das carcaças e comunicação da doença de declaração obrigatória (DDO) (Anexo I). No entanto, esta identificação não está a ser requerida por indicação da DGAV de forma sistemática ao laboratório veterinário de referência (INIAV),

não sendo colhidas e enviadas amostras de forma rotineira, sempre que a inspeção sanitária deteta lesões suspeitas. Dado a DGAV ter vindo a tratar a Linfadenite causada por MAC como uma DDO, designando-a oficialmente como “Linfadenite Tuberculosa”, torna-se ainda mais relevante estabelecer a relação entre o diagnóstico anatomopatológico, feito no matadouro, com o laboratorial, recorrendo-se, nestes caso, a técnicas de bacteriologia e de biologia molecular.

2.1.1 Género *Mycobacterium* – Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) - *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (Mah)

A tuberculose é uma doença importante, quer no Homem quer nos animais, sendo causada por espécies de bactérias da família *Mycobacteriaceae*, e mais especificamente pelas espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) (EFSA 2011b; Biet *et al.* 2005; Silva 2002). Este complexo inclui a espécie *Mycobacterium bovis*, responsável pela tuberculose bovina, e capaz de infetar uma grande variedade de animais, inclusive o Homem e os suínos (Silva 2002; Biet *et al.* 2005; Alban *et al.* 2008). Em humanos, a infeção por *M.bovis* causa uma doença similar à causada por *M.tuberculosis*, o agente primário da tuberculose humana. A principal via de transmissão de *M.bovis* ao Homem dá-se através do consumo de alimentos contaminados ou através do contato direto com animais infetados (EFSA 2011b; Biet *et al.* 2005). Existem outras micobactérias, porém, que causam uma doença clínica indistinguível da tuberculose (EFSA 2011b). Em países desenvolvidos, as micobactérias não tuberculosas (MNT) mais frequentemente identificadas no Homem e em algumas espécies animais, das quais constam os suínos, pertencem ao Complexo *M.avium* (Iwamoto *et al.* 2012; Muwonge *et al.* 2012; Lara *et al.* 2011). Além disso, o Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) tem sido reconhecido como causa da infeção oportunista mais comum em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Lara *et al.* 2011; Biet *et al.* 2005; Hiller *et al.* 2013; Eisenberg *et al.* 2012). Os membros do MAC são bactérias ubíquas e possuem a capacidade de sobreviver e de se multiplicar sob as mais variadas condições ambientais, incluindo baixo pH, temperaturas extremas, escassez de nutrientes, tratamentos com cloro ou ozono e baixo nível de oxigénio. A sua capacidade de adaptação no meio ambiente encontra-se relacionada com as próprias características fisiológicas da bactéria, como parede celular impermeável e crescimento lento (Biet *et al.* 2005; Inderlied *et al.* 1993). Esta propriedade inerente à parede celular da bactéria deve-se ao seu elevado teor em lípidos, fazendo com que seja impermeável a muitas substâncias, tais como desinfetantes, antibióticos de largo espetro e outros fármacos usados no controlo da infeção por MAC, bem como corantes aquosos comuns (Inderlied *et al.* 1993; Koneman *et al.* 1997; Biet *et al.* 2005; Starkova *et al.* 2013).

O MAC inclui 2 espécies de micobactérias, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*, incluindo diversas subespécies, com diferentes graus de patogenicidade, preferência de hospedeiro e distribuição ambiental (Álvarez *et al.* 2011; Rindi & Garzelli 2014). Como se tratam de agentes pertencentes ao género *Mycobacterium* são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), não formadores de esporos, aeróbios e imóveis (Silva 2002; Inderlied *et al.* 1993).

O *M.avium* encontra-se subdividido em quatro subespécies: *M.avium* subsp. *avium*, *M.avium* subsp. *paratuberculosis*, *M.avium* subsp. *silvaticum* e, mais recentemente identificado, *M.avium* subsp. *hominissuis* (Biet *et al.* 2005; Hibiya *et al.* 2010; Rindi & Garzelli 2014). Algumas subespécies são patogénicos restritos e raramente são encontrados fora do hospedeiro, enquanto outras são saprófitas e podem sobreviver amplamente distribuídas no ambiente, como é o caso do *M.avium* subsp. *hominissuis* (Mah) (Sánchez 2009). O Mah é o patogénico oportunista mais prevalente no Homem e em populações de suínos, estando reportado em todos os continentes (Hibiya *et al.* 2010; Sánchez 2009; Rindi & Garzelli 2014).

A infeção por Mah pode causar doença sistémica em pacientes imunocomprometidos, linfadenite cervical em crianças e infeções pulmonares em pacientes com doença pulmonar pré-existente (Agdestein *et al.* 2012; Hiller *et al.* 2013; Rindi & Garzelli 2014; Möbius *et al.* 2006). A infeção no Homem pode ocorrer através da ingestão de água potável e alimentos contaminados ou por inalação de aerossóis (Koneman *et al.* 1997; Biet *et al.* 2005; Rindi & Gardelli 2014). Em suínos pode levar ao desenvolvimento de lesões granulomatosas, usualmente localizadas nos gânglios da cabeça e nos gânglios mesentéricos, como resultado da reação inflamatória crónica que se desenvolve (Eisenberg *et al.* 2012; Silva 2002; Sánchez 2009; Mowonge *et al.* 2012). Apesar destes animais não apresentarem sintomatologia clínica, as lesões são frequentemente encontradas no matadouro quando do exame *post mortem*, o que pode levar a uma importante diminuição do valor económico da carcaça (Biet *et al.* 2005; Thorel *et al.* 2011; Morés & Silva 2001). A localização das lesões, limitada aos g.l. mandibulares e mesentéricos, sugere uma via de infeção primariamente alimentar (Morés & Silva 2001; Sánchez 2009). A infeção no animal pode resultar da exposição ao agente através da utilização de material de cama contaminado e, possivelmente, através da água, comida e do contacto com outros animais infetados (Morés & Silva 2001; Charette *et al.* 1989). Além do risco de infeção por via ambiental, diversos estudos têm reportado um parentesco genético próximo entre o Homem e os suínos sugerindo uma fonte comum de infeção ou uma possível transmissão da doença destes animais para o Homem (Hibiya *et al.* 2010; Iwamoto *et al.* 2012).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Recolha de amostras e dados

A recolha das amostras foi efetuada num único matadouro, na região de Aveiro, em Portugal, durante o período de estágio de 16 de setembro de 2013 a 6 de janeiro de 2014. O matadouro em questão, Matadouro da Beira Litoral, recebeu nesse período para abate 12643 suínos de 45 explorações, independentes entre si, dos concelhos assinalados na figura I.

No decurso da inspeção *post mortem* consideraram-se animais positivos aqueles que apresentaram lesões granulomatosas suspeitas de *M.avium* spp. nos g.l. mandibulares e/ou mesentéricos. Em todos os suínos abatidos foram pesquisadas lesões caseosas, caseocalcárias ou purulentas, principalmente ao nível destes gânglios, os quais poderiam variar de forma e tamanho.

Durante o período de estágio, foram comunicadas 56 DDO e contabilizados, ao todo, 522 animais positivos às lesões e suspeitos de infeção por *M.avium* spp. (tabela I), provenientes de explorações situadas nos concelhos assinalados na figura II.

Tendo em conta o número de suínos abatidos neste

Explorações	Concelho	Nº DDO comunicadas	Nº animais suspeitos
Exploração A	Albergaria-a-Velha	2	3
Exploração B	Alcobaça	1	1
Exploração C	Caldas da Rainha	1	3
Exploração D	Cartaxo	1	9
Exploração E	Leiria	2	2
Exploração F	Leiria	1	2
Exploração G	Mira	29	427
Exploração H	Montemor-o-Velho	12	54
Exploração I	Pombal	1	1
Exploração J	Rio Maior	1	4
Exploração K	Vendas Novas	1	6
Exploração L	Vila Nova de Famalicão	4	10

Tabela I. Número de DDO comunicadas e número de animais suspeitos de infeção por *M.avium* spp., por exploração



Figura I. Número de explorações, por concelho, que forneceram animais para o MBL



Figura II. Número de animais suspeitos de infeção por *M.avium* spp., por concelho

matadouro durante o período de 16 semanas do estágio e o número de animais suspeitos de

infecção por *M.avium* spp., a prevalência da doença encontrada em carcaças de suínos foi de 4,13%.

Para cada suíno positivo foi padronizado apenas um local de colheita de amostras obrigatório: o gânglio linfático mandibular. Assim, foi colhido um total de 153 gânglios

Explorações	Concelho	Nº Amostras
Exploração C	Caldas da Rainha	3
Exploração D	Cartaxo	6
Exploração E	Leiria	2
Exploração G	Mira	127
Exploração H	Montemor-o-Velho	1
Exploração I	Pombal	1
Exploração J	Rio Maior	2
Exploração K	Vendas Novas	6
Exploração L	Vila Nova de Famalicão	5

Tabela II. Número de amostras recolhidas, por exploração



Figura III. Número de amostras recolhidas, por concelho

mandibulares que evidenciavam macroscopicamente as lesões já descritas, provenientes de animais de 9 das 45 explorações (figura III e tabela II).

Cada gânglio linfático recolhido foi seccionado em duas partes: uma parte foi devidamente acondicionada em saco plástico, sendo posteriormente congelada a -20°C e conservada a -80°C; a outra metade foi acondicionada em recipiente plástico estéril, sendo fixada em formol a 10%. Ambas as partes da amostra foram corretamente identificadas, ficando a aguardar o processamento posterior. Os tecidos fixados em formol terão como finalidade o exame histopatológico, o qual até à altura não foi efetuado, e os criopreservados o exame direto, cultural e os testes de biologia molecular.

No que respeita à decisão sanitária, contabilizaram-se, no total, 9 rejeições totais de suínos com

Explorações	Concelho	Nº animais suspeitos (DDO)	Nº cabeças rejeitadas (reprovações parciais)	Nº rejeições totais
Exploração A	Albergaria-a-Velha	3	3	-
Exploração B	Alcobaça	1	1	-
Exploração C	Caldas da Rainha	3	3	-
Exploração D	Cartaxo	9	9	-
Exploração E	Leiria	2	2	-
Exploração F	Leiria	2	2	-
Exploração G	Mira	427	427	6
Exploração H	Montemor-o-Velho	54	54	3
Exploração I	Pombal	1	1	-
Exploração J	Rio Maior	4	4	-
Exploração K	Vendas Novas	6	6	-
Exploração L	Vila Nova de Famalicão	10	10	-

Tabela III. Reprovações totais e reprovações parciais, por exploração

lesões caseocalcárias ao nível dos g.l. mandibulares e mesentéricos (tabela III). O número de cabeças reprovadas, por exploração, foi diretamente proporcional à frequência das lesões ganglionares encontradas (tabela III).

2.3 Técnicas de diagnóstico

O diagnóstico *ante mortem* da doença em suínos pode ser feito pela reação ao teste intradérmico de tuberculina (Agdestein *et al.* 2011; Morés & Silva 2001), não sendo contudo efetuado por rotina, em Portugal. No *post mortem*, as micobacterioses podem ser diagnosticadas por exame histopatológico, por cultura da micobactéria ou por técnicas de biologia molecular (Agdestein *et al.* 2011; Koneman *et al.* 1997; Morés & Silva 2001). A escolha do teste vai depender das circunstâncias e do grau de sensibilidade requerido (Thorel *et al.* 2011).

O trabalho laboratorial foi desenvolvido no Laboratório de Referência para Micobactérias, do Departamento de Doenças Infecciosas, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Das 153 amostras recolhidas entre setembro e dezembro de 2013, até ao momento, apenas 38 foram processadas e sujeitas a exame direto e cultural.

No decurso deste estágio, durante o trabalho de âmbito laboratorial, foi ainda possível participar no processamento final de 47 amostras da fase inicial deste projeto colhidas entre janeiro e fevereiro de 2013, no âmbito de outro estágio curricular do ICBAS-UP (Enguião 2013) e agora submetidas ao teste GenoType Mycobacterium CM e à técnica de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).

2.3.1 Exame direto

Inicialmente, cada amostra foi descongelada e macerada, com o auxílio de almofariz e pilão, ao qual se adicionou, posteriormente, o tampão fosfato pH 6,8. A amostra de produto obtido foi, de seguida, sujeita à técnica de descontaminação e homogeneização, para exame direto e cultural, de pesquisa de agentes do género *Mycobacterium*, descrita em pormenor, no Anexo II. A descontaminação feita por combinação de dois reagentes, o N-acetil-L-cisteína e o hidróxido de sódio, menos tóxica para as micobactérias, tem como objetivo a inativação dos microrganismos contaminantes que possam estar presentes. O limite de exposição ao agente de descontaminação são 15 minutos, após o qual deve ser neutralizado. A mistura foi centrifugada de forma a concentrar as micobactérias (Koneman *et al.* 1997).

Foram preparadas lâminas a partir do sedimento obtido de 38 das amostras colhidas e coradas por Ziehl-Neelsen (ZN). Esta coloração permite identificar bacilos álcool-ácido resistentes que possuem uma parede celular com capacidade de fixar determinados corantes, como a fucsina,

resistindo à descoloração após exposição a um álcool-ácido. Após a aplicação do corante *Armand* os bacilos aparecem corados de vermelho contra um fundo azul.

2.3.2 Exame cultural

A par do exame direto, procedeu-se ao exame cultural das 38 amostras. As suspensões bacterianas foram inoculadas em meios de cultura sólidos, Löwenstein Jensen® (LJ) e Coletsos®, que possibilitam a cultura de micobactérias exigentes, e em meio de cultura líquido, BBL™ MGIT™. Este último baseia-se na deteção fluorimétrica de consumo de oxigénio, pelas micobactérias. Todos os meios de cultura foram incubados a 37°C, por um período de 42 dias para o meio líquido e 6 a 8 semanas para os meios sólidos (Koneman *et al.* 1997; Baptista *et al.* 2005).

2.3.3 Métodos Moleculares

2.3.3.1 Extração de DNA

Das 47 culturas, feitas a partir das 47 amostras anteriormente referidas (Enguião 2013), apenas 24 (51%) foram consideradas positivas. Na sequência deste resultado, procedeu-se à extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de bactérias cultivadas em meios sólidos (LJ ou Coletsos®) ou em meio líquido (BBL™ MGIT™) destas 24 culturas positivas.

A extração do DNA (Anexo III) teve como finalidade a aplicação, posterior, do teste GenoType Mycobacterium CM e da técnica de PCR “multiplex”.

2.3.3.2 Teste GenoType Mycobacterium CM

O teste GenoType Mycobacterium CM é baseado na tecnologia DNA·STRIP e permite a identificação de várias espécies de micobactérias, entre elas o *M.avium* spp. e o *M.intracellulare*, dentro do MAC. Este teste só pode ser usado para detetar micobactérias após a respetiva cultura.

O procedimento completo é dividido em 3 passos: extração do DNA a partir do material cultivado, amplificação multiplex com *primers* biotinilados e hibridização reversa, encontrando-se todo o procedimento descrito, em detalhe, no Anexo III.

No final, as tiras usadas na realização do teste são avaliadas quanto às bandas positivas, com o auxílio de uma tabela de interpretação (figura V; Anexo III). Com base nesta tabela, é possível determinar as espécies presentes nas amostras recolhidas.

2.3.3.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) “multiplex”

O PCR é a técnica que permite que sequências de inserção (IS) específicas, neste caso para micobactérias, sejam identificadas e amplificadas mediante a utilização de vários pares de *primers* (Koneman *et al.* 1997).

2.3.3.3.1 Amplificação

A amplificação dos fragmentos pretendidos de DNA foi efetuada a partir do DNA extraído das micobactérias presentes nas 24 culturas positivas.

A mistura de reação de PCR “multiplex” foi preparada para um volume final de 40 microlitros (μl), tendo sido utilizados 10 μl de DNA genómico, 2 μl de IS901 (forward e reverse), 2 μl de IS1245 (forward e reverse), 4 μl de *dnaJ* (forward e reverse), 20 μl de MyTaqTM Red Mix e 2 μl de Água Ultrapura (Promega®).

A escolha dos *primers* IS901, IS1245 e *dnaJ* foi feita tendo em conta a bibliografia encontrada e os trabalhos desenvolvidos, até agora, por Miranda *et al.* (2011) e Moravkova *et al.* (2008).

Sequência de inserção	Sequência do Primer	Tamanho do produto de PCR “multiplex”
IS901	5' - GGA TTG CTA ACC ACG TGG TG - 3' 5' - GCG AGT TGC TTG ATG AGC G - 3'	577 pares de bases (pb)
IS1245	5' - GAG TTG ACC GCG TTC ATC G - 3' 5' - CGT CGA GGA AGA CAT ACG G - 3'	385 pares de bases (pb)
dnaJ	5' - GAC TTC TAC AAG GAG CTG GG - 3' 5' - GAG ACC GCC TTG AAT CGT TC - 3'	140 pares de bases (pb)

Tabela IV. Sequência dos *primers* IS901, IS1245 e *dnaJ* e tamanho dos produtos amplificados

A técnica permite a identificação de *M.avium* subsp. *avium*/*M.avium* subsp. *silvaticum* pela presença da IS901 (577 pb), IS1245 (385 pb) e *dnaJ* (140 pb) e *M.avium* subsp. *hominissuis* pela presença da IS 1245 (385 pb) e *dnaJ* (140 pb).

As condições de amplificação, utilizando os *primers* descritos, são as da tabela V.

Ciclos	Temperatura	Função	Tempos
1	96°C	Ativação da Taq polimerase	2 minutos
35	96°C	Desnaturação da cadeia de DNA	10 segundos
	58°C	Emparelhamento dos <i>primers</i>	10 segundos
	72°C	Extensão do segmento de DNA pela enzima Taq polimerase	1 minuto
1	72°C	Continuação da extensão	2 minutos

Tabela V. Ciclos, temperaturas, funções e tempos utilizados na reação de PCR “multiplex”

Em todas as reações de PCR “multiplex” realizadas foi incluído um controlo positivo, DNA da estirpe *M.avium* subsp. *avium* e *M.avium* subsp. *hominissuis*, e um controlo negativo, Água Ultrapura.

2.3.3.3.2 Eletroforese

Os fragmentos de DNA resultantes da reação de PCR “multiplex” foram separados mediante eletroforese horizontal, num gel de agarose a 2%, de acordo com o seu peso molecular. Foi preparada uma mistura de 1g de agarose (Agarose LE Seakem®) em 50 ml de tampão de Tris-Borato-EDTA (TBE). A mistura foi aquecida no microondas de forma a dissolver por completo a agarose. A esta solução foi adicionado 2 µl de solução de brometo de etídio (5mg/ml). O gel foi, de seguida, transferido para um suporte, com pente, até solidificar. Posteriormente foi colocado numa tina de eletroforese, à qual se adicionou mais tampão TBE. Foi adicionado 10 µl do produto amplificado mais 5 µl de tampão de carregamento em cada poço, e 10µl do marcador de peso molecular com graduação de 50 pb, num dos extremos do gel, iniciando-se a eletroforese a uma voltagem de 100 Volts, durante 1 hora. Os produtos de PCR “multiplex” foram visualizados, após eletroforese, mediante um transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat®), com o software específico de tratamento de imagens acoplado ao sistema (Gel Doc®).

2.4 Resultados

Das 153 amostras recolhidas entre setembro e dezembro de 2013, 38 foram processadas e sujeitas a exame direto tendo-se observado bacilos corados por fucsina compatíveis com

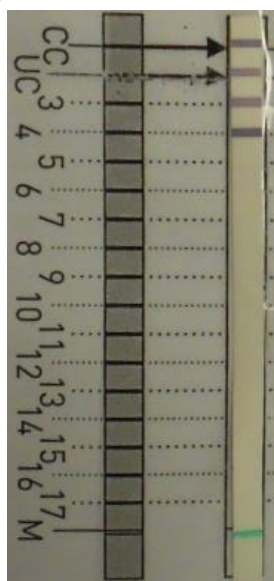


Figura IV. Tira de Teste GenoType Mycobacterium CM usada para uma das 24 amostras

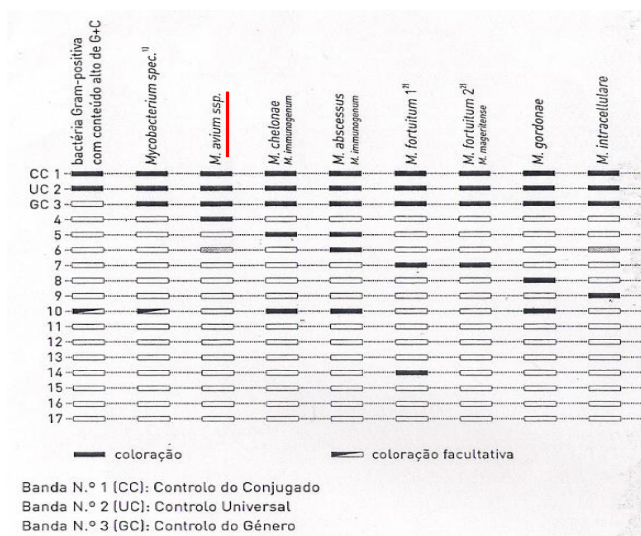


Figura V. Excerto da tabela de interpretação

Mycobacterium spp., em 24 dos 38 gânglios analisados. No que respeita ao exame cultural destas 38 amostras, até à data apenas 9 (24%) culturas evidenciaram crescimento em meio líquido, apresentando bacilos cocóides muito semelhantes aos do MAC.

Como já referido, das 47 amostras recolhidas entre janeiro e fevereiro de 2013, e cultivadas em meio sólido e líquido, 24 foram consideradas positivas sendo responsáveis pelo aparecimento da primeira, segunda, terceira e quarta bandas, nas respetivas tiras (figura IV) usadas no Teste GenoType Mycobacterium CM. A primeira banda, ou zona de reação, corresponde ao Controlo do Conjugado (CC) e documenta a eficiência da ligação do conjugado e da reação do substrato. A segunda banda corresponde à zona de Controlo Universal (UC) que deteta todas as micobactérias conhecidas e membros do grupo das bactérias Gram+, com elevado conteúdo de Guaninas e Citosinas. A terceira banda, Controlo do Género (GC), documenta a presença de um membro do género *Mycobacterium*, e a quarta banda é específica da espécie de micobactéria em questão, neste caso *M.avium* spp.

Todos os fragmentos de DNA resultantes da reação de PCR “multiplex” das 24 amostras, de

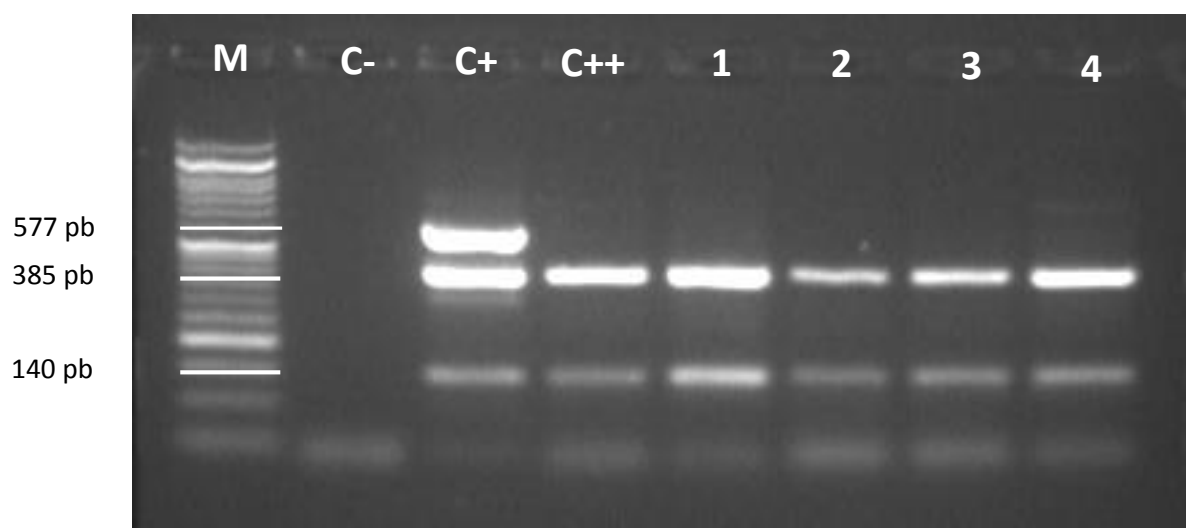


Figura VI. Eletroforese do DNA amplificado das primeiras 4 amostras analisadas; M: marcador; C-: controlo negativo; C+: controlo positivo (*M.avium* subsp. *avium*); C++: controlo positivo (*M.avium* subsp. *hominissuis*).

material cultivado, foram detetados pela técnica de eletroforese. Os fragmentos produzidos apresentaram os tamanhos 385 pb e 140 pb (figura VI).

2.5 Discussão

São diversos os métodos que permitem o diagnóstico das micobacterioses (Agdestein *et al.* 2011; Koneman *et al.* 1997; Morés & Silva 2001). Entre eles, a técnica de coloração de ZN continua a ser uma das mais usadas. Além de representar um método diferencial para micobactérias, é barato e de rápida aplicação. Este método é pouco sensível na presença de um baixo número de

bactérias (Karadag *et al.* 2013) tendo, no entanto, permitido a identificação de BAAR em 1 das explorações de suínos (exploração G),

A cultura das micobactérias foi efetuada tanto em meio sólido como em meio líquido, sendo ambos favoráveis ao crescimento destas. Apesar da identificação e classificação das colónias visíveis ser um processo bastante demorado (6 a 8 semanas), a técnica da cultura permanece como o “gold standard” para o diagnóstico das micobacterioses (Karadag *et al.* 2013). Até à data, apenas 9 culturas evidenciaram crescimento em meio líquido, o que poderá estar relacionado com o longo período de espera necessário para a observação das colónias. Baptista *et al.* (2005) refere, contudo, que a técnica descrita poderá nem sempre ser eficaz para o crescimento do MAC. A técnica da descontaminação, aplicada em tempo ou concentração excessiva, é apontada também por Tirkkonen *et al.* (2013) como uma possível causa da inativação das micobactérias e consequente ausência de colónias visíveis no meio.

O Teste GenoType Mycobacterium CM oferece a possibilidade de diagnóstico de infeção no caso em que a cultura é positiva. Este teste revelou-se rápido e eficaz ao revelar a presença da espécie *M.avium* spp. nas 24 amostras de material cultivado. Em todas as tiras foi observada a presença das primeiras 3 bandas, que funcionam como controlo, e de uma quarta, específica da espécie *M.avium* spp.

Para identificar ao nível da subespécie os isolados de *M.avium* spp., recorreu-se à técnica de PCR “multiplex”, baseado nas sequências de inserção IS1245, IS901 e dnaJ. Este método simples, rápido e preciso (Karadag *et al.* 2013) permite a diferenciação entre o *M.avium* subsp. *avium*, o *M.avium* subsp. *silvaticum* e o *M.avium* subsp. *hominissuis*. A ausência dos produtos de amplificação, observada na eletroforese, dos elementos de inserção IS901, e a presença dos produtos de amplificação dos elementos de inserção IS1245 e dnaJ indica que a subespécie de *M.avium* spp. estudada pertence ao Mah, e que se encontra presente em 24 dos gânglios já processados. Assim, confirma-se a presença da subespécie Mah em 1 das 7 explorações sujeitas a amostragem, entre janeiro e fevereiro de 2013 (Enguião 2013).

3. Discussão do efeito das alterações propostas, pela EFSA, no atual método de inspeção de suínos e na consequente deteção do agente *Mycobacterium* spp.

As zoonoses transmitidas por alimentos têm vindo a adquirir um impacto crescente nos países industrializados. Mais de 10% da população humana sofre anualmente não só destas zoonoses,

mas também de doenças e/ou infecções, provocadas por uma multiplicidade de agentes, que são transmissíveis entre os animais e os humanos, através do consumo de alimentos (Käferstein *et al.* 1999; Schlundt *et al.* 2004; Fosse *et al.* 2008). Desta forma, o controlo destes perigos biológicos adquire contornos de elevada relevância em segurança alimentar (Fosse *et al.* 2008). Em 2010, a Comissão Europeia (CE) solicitou à EFSA a elaboração de um parecer científico tendo em vista a modernização dos atuais métodos de inspeção de carnes na União Europeia (UE). Segundo a CE estes métodos não têm em conta determinados perigos, transmitidos pelo consumo de alimentos, relevantes para a saúde humana e animal. Seguindo uma abordagem baseada no risco, a EFSA identificou e classificou estes perigos elaborando, simultaneamente, 6 pareceres sobre os procedimentos de inspeção de carnes em bovinos (EFSA 2013d), ovinos e caprinos (EFSA 2013c), caça de criação (EFSA 2013b), solípedes domésticos (EFSA 2013a), aves (EFSA 2012) e suínos (EFSA 2011a).

Considerando a inspeção de suínos acompanhada durante o estágio, a casuística relativa a lesões ganglionares granulomatosas e os resultados laboratoriais obtidos, torna-se relevante discutir o efeito das alterações sugeridas pela EFSA (2011a) ao atual método de inspeção de suínos. Segundo o parecer da EFSA e a sua avaliação do risco, *Salmonella* spp. é considerado um perigo de alta relevância, *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* e *Trichinella* spp assumem média relevância e *Mycobacterium* spp. é considerado de baixa relevância (EFSA 2011a). Esta categorização decorre segundo a EFSA da reduzida prevalência do agente *Mycobacterium* spp. em carcaças de suínos, da baixa incidência e severidade da doença causada no Homem e por não ter sido ainda comprovada a transmissão da doença pelo consumo de carne de suíno ou dos produtos derivados do mesmo (EFSA 2011a).

3.1 Avaliação do risco

Segundo o Regulamento CE nº 178/2002, a legislação alimentar deve basear-se numa análise dos riscos de forma a alcançar um elevado nível de proteção da saúde humana, tendo como primeiro passo a avaliação do risco. Esta consiste na avaliação dos efeitos adversos conhecidos ou potencialmente resultantes da exposição do homem a perigos veiculados pelos alimentos. É um processo, de base científica, suportado em 4 etapas: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (Fosse *et al.* 2008; Regulamento CE nº 178/2002).

3.1.1 Identificação do perigo

Os principais perigos biológicos em suínos, na Europa, foram identificados e caracterizados em 2 categorias, por Fosse *et al.* (2008): a categoria dos perigos estabelecidos, por já terem sido identificados nesses animais, por já terem sido comprovadamente responsabilizados pela doença clínica no Homem e pela sua capacidade de transmissão, e a categoria dos perigos suspeitos, por já terem sido reportados em publicações científicas devido à sua capacidade de transmissão ao Homem, mas que ainda não foram claramente identificados, ou por serem descritos em suínos mas, ao mesmo tempo, a sua patogenicidade não ter sido comprovada. Estes perigos podem, além disso, ser classificados de acordo com a sua distribuição geográfica e/ou comparados com perigos que, no passado, foram relevantes para a história da segurança alimentar. Segundo Fosse *et al.* (2008), foram identificados 35 perigos biológicos, passíveis de serem transmitidos ao Homem pelo consumo de carne de suíno: 12 parasitários, 9 virais e 14 bacteriológicos, dos quais consta o *Mycobacterium* spp.. Este agente é considerado, atualmente, um perigo estabelecido a nível europeu (Fosse *et al.* 2008; Miranda *et al.* 2011; Tirkkonen *et al.* 2013).

3.1.2 Caracterização do perigo

Para a caracterização do perigo biológico em questão, o *Mycobacterium* spp., é necessário

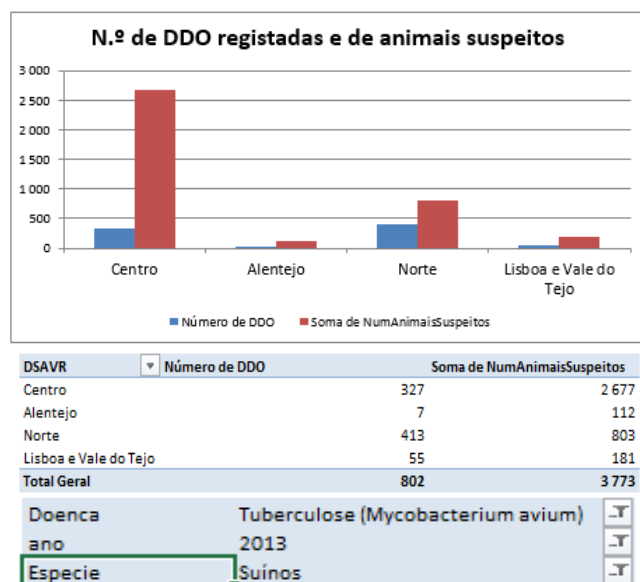


Figura VII. Número de DDO comunicadas e de animais suspeitos de infecção por *M. avium* spp., no ano de 2013, em Portugal (DGAV 2013)

Número de animais abatidos em 2013

DSVR: (Tudo)
DIV: (Tudo)
NCV: (Tudo)
Estabelecimento: (Tudo)
mes: (Tudo)

Rótulos de Linha: Volume de abate regular
Suínos: 4 248 329

Número de animais abatidos em 2013

DSVR: DSVR Centro
DIV: (Tudo)
NCV: (Tudo)
Estabelecimento: (Tudo)
mes: (Itens múltiplos)

Rótulos de Linha: Volume de abate regular
Suínos: 356 073

Figura VIII. Número de animais abatidos, na região centro e a nível nacional, em 2013 (DGAV 2013)

proceder-se à recolha de informação para o cálculo da sua prevalência em carcaças de suínos. É igualmente avaliada a severidade da doença, com base em dados obtidos sobre o número de hospitalizações e taxas de letalidade. Salienta-se que para alguns perigos os dados sobre as prevalências ou ocorrências são sistematicamente recolhidos, enquanto para outros, como o

Mycobacterium spp., tal não acontece (Fosse *et al.* 2008; Morés & Silva 2001; Tirkkonen *et al.* 2013) Os perigos são categorizados de acordo com a frequência do seu aparecimento (Fosse *et al.* 2008). Segundo a EFSA (2011a), um perigo é classificado como sendo de alto risco quando a sua frequência de ocorrência é superior a 5%. Para uma frequência entre 0,1-5% os perigos são de médio risco e para valores abaixo dos 0,1% são de baixo risco. O *Mycobacterium* spp. está categorizado como um perigo de baixo risco de acordo com estes critérios (EFSA 2011a). Contudo, segundo Tirkkonen *et al.* (2013) a prevalência do agente em carcaças de suínos, na Finlândia, ronda os 0,34%, podendo atingir os 0,85%, no seu valor máximo. Fosse *et al.* (2008) refere que, na Europa, esta prevalência chega aos 5,8%, valores muito acima dos considerados pela EFSA para o agente *Mycobacterium* spp.. Em Portugal, em 2013, verificou-se uma situação idêntica à preconizada pela EFSA: tendo em conta o número de suínos abatidos no ano de 2013 (4 248 329 animais) (figura VIII) e o número de animais suspeitos de infeção, mais especificamente, por *Mycobacterium avium* spp. (3 773 animais) (figura VII), a prevalência da doença encontrada em carcaças de suínos foi de 0,09%, enquadrando-se na categorização da EFSA. Contudo, se nos focarmos na Região Centro, onde mais casos foram registados, a prevalência da doença em 2013 chegou aos 0,75% (356 073 animais abatidos; 2 677 animais suspeitos) (figura VII e VIII), tendo inclusive atingido os 4,13 % (dados não publicados) num dos estabelecimentos de abate desta mesma região, no período observado entre setembro e dezembro de 2013. Estes são valores já indicativos de um agente de médio risco, contrariando o preconizado pela EFSA (2011a), a nível europeu. No que respeita à severidade da doença clínica, o *Mycobacterium* spp. é responsável por uma taxa de letalidade inferior a 0,1%, segundo a EFSA (2011a). Fosse *et al.* (2008) refere, contudo, que o *Mycobacterium* spp. se revelou um dos perigos com mais alta severidade, a seguir aos agentes *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*, com taxas de hospitalização na ordem dos 50% e taxas de letalidade na ordem dos 1,0%. Numa escala de 1 a 12, sendo 1 o grau mais elevado em termos de severidade da doença e 12 o mais baixo, 3 é o grau atribuído a este agente patológico (Fosse *et al.* 2008). No Homem, a infeção por tuberculose é considerada severa (Alban *et al.* 2008). No caso da infeção humana por MNT, é referido que esta está presente apenas no caso de grupos vulneráveis da população, crianças, imunodeprimidos, bem como pacientes com doença pulmonar pré-existente (Eisenberg *et al.* 2012; Möbius *et al.* 2006; Rindi & Garzelli, 2014). Contudo, embora, a doença associada às MNT tenha sido reportada primariamente em imunocomprometidos, os casos observados em pacientes sem qualquer condição predisponente para tal têm aumentado, levando à consciencialização de que este poderá ser um problema de saúde pública emergente e global

(Iwamoto *et al.* 2012). Segundo dados obtidos na Dinamarca, os perigos considerados pela EFSA (2011a) como tendo maior impacto na saúde pública, nomeadamente a *Salmonella enterica*, a *Yersinia enterocolitica* e o *Campylobacter* spp. têm apenas médio ou moderado impacto, neste país, quando comparados com o *Mycobacterium* spp. (figura IX) (Alban *et al.*

Pathogen	Assessment
<i>Streptococcus suis</i>	Mild to Severe
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mild
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Mild
<i>Mycobacterium bovis</i>	Severe
<i>Mycobacterium avium</i>	Severe among vulnerable groups
<i>Campylobacter</i> spp.	Moderate
<i>Salmonella</i> spp.	Moderate
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Moderate

Figura IX. Avaliação qualitativa do impacto de infecções específicas, possivelmente relacionadas com suínos e com o consumo da sua carne em pacientes, na Dinamarca, em 2008 (adaptado de Alban *et al.* 2008).

2008). Na Eslovénia, de 86 pacientes confirmados com infeção por *M.avium* spp., 14 desenvolveram doença clínica (Pate *et al.* 2008). Biet *et al.* (2005) refere que o número de casos por infeção por MAC em pacientes com SIDA atingiu frequências elevadas, na ordem dos 25 a 50%. Lara *et al.* (2011) constata que 40% dos pacientes imunocomprometidos são

infetados por micobactérias pertencentes ao MAC. Tirkkonen *et al.* (2013) afirma ainda que as MNT foram responsáveis por um total de 26.000 casos de doença, entre 1991 e 1996, em 14 países de todo o mundo. Tendo em conta os diversos autores e trabalhos citados, não se verifica unanimidade ou sequer coerência com o parecer da EFSA (2011a).

3.1.3 Avaliação da exposição

A avaliação da exposição ao agente *Mycobacterium* spp. é estimada com base no cálculo da incidência de casos clínicos em humanos, resultantes da ingestão de carne de suíno. Segundo a EFSA (2011) o *Mycobacterium* spp., tal como já previamente referido, é considerado um perigo biológico de baixa incidência, ou seja, é responsável por menos de um caso por cada 100 000 habitantes por ano. Na Dinamarca, os casos que surgem no Homem causados por MAC não são notificáveis, o que dificulta o conhecimento da incidência exata da doença no país contudo, estima-se que aproximadamente 100 casos ou menos por MAC ocorram por ano (Alban *et al.* 2008), apoiando o referido pela EFSA (2011a). Pelo contrário, Biet *et al.* (2005) refere a ocorrência de uma média de 10 casos por 100 000 habitantes e Tirkkonen *et al.* (2013) constata que, durante o ano de 2012, ocorreram 12,2 infeções por cada 100 000 habitantes.

3.1.4 Caracterização do risco

Como já mencionado, o *Mycobacterium* spp. é considerado um perigo de baixo risco, segundo o parecer da EFSA (2011a). Contudo, no que respeita à incidência de casos clínicos no Homem, Biet *et al.* (2005) e Tirkkonen *et al.* (2013) referem taxas de incidência que igualam ou

ultrapassam os 10 casos por 100 000 habitantes. No que concerne à taxa de letalidade, Fosse *et al.* (2008) revela, não só, a nível europeu uma taxa de letalidade superior, como taxas de hospitalizações na ordem dos 50%. Biet *et al.* (2005) reforça estes dados referindo taxas de hospitalizações na ordem dos 25 a 50% em pacientes com SIDA, que desenvolvem infeções por MAC. A prevalência do agente encontrada em carcaças de suínos é referida por Tikkonen *et al.* (2013), Fosse *et al.* (2008) e por dados recolhidos, na Região Centro em Portugal (figura VII e VIII), como sendo superior à indicada pela EFSA (2011a). A conclusão que se pode tirar desta avaliação de risco é que para o agente *Mycobacterium* spp., a infeção resultante do consumo de carne contaminada parece ser relativamente ser rara em alguns países da Europa (EFSA 2011a; Alban *et al.* 2008). Contudo, naqueles onde há risco de ocorrência desta doença e não existe nem uma boa coordenação entre os sistemas de vigilância humana, veterinária e ambiental, nem medidas eficazes de combate a este perigo microbiológico, o *Mycobacterium* spp. poderá representar um importante risco para a saúde pública (ECDC 2011).

3.2 Fonte de atribuição

Em adição aos dados sobre frequências de ocorrências dos perigos biológicos em carcaças de suínos e de casos no Homem, foram tidas em conta pela EFSA (2011a) evidências que sugerissem uma ligação epidemiológica entre os casos humanos e o consumo de carne ou produtos derivados dos suínos, sustentando as alterações ao atual método de inspeção sanitária. Existem diversos métodos de avaliação que nos permitem estabelecer esta ligação, desde dados de surtos, subtipagem microbiológica, estudos epidemiológicos, avaliações comparativas de exposição e opiniões estruturadas de especialistas (EFSA 2011a). Contudo, a informação acerca da fonte de atribuição para perigos específicos, como é o caso do agente *Mycobacterium* spp., é escassa (Morés & Silva 2001; Fosse *et al.*, 2008). Para colmatar estas falhas, o documento elaborado pela EFSA baseou-se tanto na literatura como na opinião de especialistas. É defendido que como até agora não existe uma clara evidência de transmissão deste agente ao Homem através do consumo de carne de suíno, este perigo é considerado pouco relevante (EFSA, 2011a). Fosse *et al.* (2008) também refere que a tuberculose induzida pelo consumo de carne é rara na Europa. Contudo, defende que existem evidências desta transmissão ao Homem, que se traduzem muitas vezes em repercussões sistémicas e até na morte (Fosse *et al.* 2008). Outros autores referem que os alimentos poderão ser uma possível fonte e via de transmissão de *M.avium* subsp. *avium* (Biet *et al.* 2005). Estirpes idênticas têm sido identificadas em humanos e suínos, demonstrando que estes poderão ser uma fonte de infeção ou mesmo um reservatório para o Homem e os outros animais (Alban *et al.* 2008). A Holanda é um dos poucos países da UE onde

existe um programa de vigilância para a presença de *M.avium* spp. nas explorações. Tal medida deve-se à constante preocupação de uma possível transmissão da infeção por via alimentar (Alban *et al.* 2008). Komijn *et al.* (1999) isolou agentes do MAC em 191 pacientes na Holanda, os quais tipificou através de técnicas de análise de DNA, como a Restriction Fragment Length Polymorfism (RFLP). A análise posterior baseada na IS1245 RFLP revelou que 61% dos padrões de RFLP dos isolados humanos e 59% dos isolados de suínos apresentavam, pelo menos, 75% de similaridade de tipo IS1245 RFLP. Tal indica que os suínos podem ser um importante veículo para as infeções por *M.avium* spp. no Homem, à semelhança do que é citado por Hiller *et al.* (2013), ou que ambos partilham fontes comuns de infeção (Komijn *et al.* 1999). O consumo de alimentos, não sujeitos a uma rigorosa inspeção, e de alimentos mal cozinhados têm sido referidos como fatores de risco para o Homem (Lara *et al.* 2011; Pate *et al.* 2008).

3.3 Alterações propostas ao atual sistema de inspeção sanitária em Suínos

Segundo a EFSA (2011), a única forma de garantir um controlo efetivo dos perigos biológicos veiculados pelas carnes e do risco associado a estes, é através de uma garantia de segurança. Para tal, é fundamental que se apliquem as mudanças necessárias logo no início de toda a cadeia alimentar. Ao nível da exploração, é requerida uma melhoria ao nível da elaboração do documento que contém as informações sobre a cadeia alimentar (IRCA) descrevendo a história clínica e os antecedentes dos efetivos. Pretende-se assim que à chegada ao matadouro, seja possível fazer uma categorização fundamentada dos lotes de animais, em termos do risco apresentado. No que se refere ao processo de abate, as medidas para a redução do risco são focadas na prevenção da contaminação microbiológica, por meio da tecnologia e dos processos de higiene (baseados nas Boas Práticas de Higiene e no Hazard Analysis and Critical Control Points - HACCP). Assim, recomenda-se a omissão de palpações e/ou incisões nas carcaças e órgãos durante a inspeção *post mortem*, ao longo do abate de rotina, ao contrário do que vigora atualmente na UE (Regulamento CE nº 824/2004). Estas são algumas das alterações propostas pela EFSA (2001a) para o sistema de inspeção de carnes e que poderão implicar a redução da probabilidade de deteção de algumas doenças, como é o caso das micobacterioses.

3.3.1 Inspeção *Ante Mortem*

A inspeção *ante mortem* deve ser efetuada a todos os animais antes do abate e após a chegada dos animais às instalações do matadouro (Regulamento CE nº 854/2004; Gil 2005; EFSA 2011a). Consiste principalmente na observação individual ou do grupo dos animais apresentados para o abate, na verificação da sua identificação, na avaliação do seu grau de limpeza e tendo em

conta a IRCA. A inspeção em vida inclui um exame clínico simples que tem como objetivo a avaliação da condição física, a verificação do cumprimento das normas de bem estar animal e a identificação de animais doentes ou detentores de determinada condição que possa ser transmissível aos outros animais ou ao Homem através do contacto ou do consumo da sua carne (Regulamento CE nº 854/2004; EFSA 2011a).

Como os agentes considerados pela EFSA (2011a) como mais relevantes, em saúde pública, não podem ser detetados mediante este exame não foram consideradas quaisquer alterações à exceção do caso particular da IRCA.

3.3.1.1 IRCA

A atual legislação europeia (Regulamento CE nº854/2004; Regulamento CE nº853/2004) requer que a IRCA dos animais que chegam ao matadouro seja analisada antes do abate. A EFSA defende que, como o recurso à IRCA contribui para o controlo dos principais perigos considerados neste seu parecer, esta informação deve continuar a ser utilizada podendo ser ainda mais detalhada (EFSA 2011a). Desta forma, a IRCA deverá ser melhorada ao ponto de permitir ao MVO categorizar os suínos que chegam ao matadouro em 2 grupos, um de baixo e outro de alto risco, de modo a sofrerem um maneiio diferenciado no estabelecimento de abate e, se necessário, um exame *post mortem* simples ou detalhado. A EFSA (2011a) defende que deve ser considerado se os animais provêm de explorações com sistemas “integrados”, onde se aplicam as boas práticas de higiene e gestão ambiental, princípios do HACCP, onde se encontram implementados sistemas de garantia de segurança e disponibilidade de informação relativa a dados epidemiológicos, ao bem estar e à identificação animal ou em contraponto, sistemas “não integrados”. Em Portugal, o que se verifica é que não existe um registo oficial de explorações com sistemas “integrados”, constituindo estas muito provavelmente uma parte reduzida do setor de produção suína nacional. A razão deste limitado número prende-se com os custos associados à implementação destes sistemas, bem como à crise que o setor enfrenta. Assim, no contexto atual, a elaboração da IRCA com base nestas informações torna-se inviável para a maioria das explorações. Atualmente, a IRCA é insuficientemente utilizada. De acordo com o documento elaborado pela EFSA (2011a), tal deve-se à falta de indicadores adequados e harmonizados que possam ajudar à categorização do risco dos lotes de suínos que chegam ao matadouro, de acordo com o risco que possam representar para a Saúde Pública. Em Portugal ainda se encontra em implementação o programa de controlo e erradicação da doença de Aujeszky (Decreto-Lei nº 85/2012). Desta forma, existem efetivos que até ao momento, pelo que nos é dado saber, não foram sujeitos a rastreio serológico a fim de se estabelecer, pela primeira vez, o seu estatuto

sanitário, permitindo ao MVO fazer a categorização dos lotes com base nesta informação. No que diz respeito ao *Mycobacterium* spp., é relevante que a IRCA contenha informação relativa a ocorrências anteriores de linfadenite tuberculosa suína (LTS) na exploração. Desta forma, a informação que chegar ao matadouro alertará o MVO para o fato de aquele lote específico dever ser sujeito a um exame *post mortem* mais detalhado e implicando, se considerado necessário, a alteração da ordem do seu abate para o final. No entanto, apesar da existência deste campo de preenchimento obrigatório na IRCA e de outros referentes à administração de medicamentos/ produtos de uso veterinário, exames efetuados e outra informação relevante, estes documentos continuam a chegar aos matadouros incompletamente preenchidos, como se verifica no Anexo IV. O grande problema associado à IRCA prende-se com a relutância dos responsáveis pelas explorações/produtores, no preenchimento dos dados requeridos neste documento, mesmo que na maioria das vezes a informação necessária para tal exista ao nível das explorações. Neste sentido, não poderá ser feita uma correta utilização da IRCA, com o aproveitamento de todo o seu potencial, sem constar dela toda a informação essencial e sem antes se uniformizar e tornar efetivamente obrigatório o seu preenchimento integral.

3.3.2 Inspeção *Post Mortem*

O Regulamento CE nº 854/2004 descreve a inspeção *post mortem* como uma exame anatomopatológico que tem como objetivo a deteção e eliminação de anomalias macroscópicas que possam afetar a salubridade das carnes, sendo tomadas para isso precauções no sentido de assegurar a contaminação mínima da carne pelas técnicas estabelecidas. Nesta fase, deve ser prestada especial atenção à deteção de doenças zoonóticas e de declaração obrigatória, devendo o MVO estar ciente da obrigatoriedade da notificação dos casos suspeitos, no caso das DDO, e da necessidade da confirmação laboratorial das mesmas (Decreto-Lei nº 39:209 de 14 de Maio de 1953).

O exame *post mortem* de carcaças e órgãos é baseado na inspeção visual, palpação, incisão e, quando adequando no recurso a exames laboratoriais. A informação obtida é usada pelo MVO na avaliação da salubridade das carnes, tendo em conta a sua tomada de decisão. Segundo o previsto pelo novo quadro de garantia de segurança alimentar em carcaças de suínos proposto pela EFSA (2011a), deverá ser considerada a omissão da palpação e incisão durante a inspeção *post mortem*, no abate de rotina, desde que não tenham sido detetadas quaisquer anomalias no exame *ante mortem*. A justificação invocada prende-se com a prevenção da contaminação cruzada por *Salmonella* spp./ *Yersinia enterocolitica*, alegadamente potenciada pelo recurso a estas manipulações e incisões do MVO. Segundo a EFSA (2011a), o risco associado à contaminação

cruzada é maior do que o risco associado à potencial redução na detecção de condições patológicas.

É referido, ainda, que a omissão da palpação/incisão no exame *post mortem* não deve ser feita em suínos suspeitos de doença ou de condições tais que possam afetar adversamente a saúde humana e animal. Estes animais devem ser separados, submetidos a inspeção *ante mortem* detalhada, abatidos separadamente e sujeitos a exame *post mortem* igualmente detalhado, incluindo testes laboratoriais, se necessário. No caso de se detetar qualquer anomalia durante a inspeção visual de rotina e no sentido de se chegar a um diagnóstico é recomendado manter a prática da palpação, da incisão e do recurso aos testes laboratoriais, se relevante. Contudo, preconiza-se ao mesmo tempo a prevenção da contaminação cruzada das carcaças, através da redução das incisões ao mínimo essencial. Por definição, o novo método de inspeção proposto pela EFSA (apenas visual), não detetará condições onde a palpação e/ou incisão sejam requeridas (EFSA 2011a). Haverá necessariamente alguma redução na probabilidade de detecção com esta mudança do sistema atual para o proposto, sendo que a magnitude desta diferença irá variar consoante a doença/condição: para os casos típicos de doença/condições que tendem a afetar vários órgãos, a diferença tenderá a ser mínima; para casos iniciais de uma diversa gama de doenças, a diferença poderá ser substancial. No caso do estágio inicial da infeção por *Mycobacterium* spp., em que as lesões tendem a ser limitadas a um ou a um pequeno número de órgãos, cuja detecção depende da palpação e/ou incisão, haverá seguramente uma redução substancial na probabilidade de identificação. De acordo, ainda, com o parecer da EFSA em análise, uma forma de mitigar a redução da probabilidade de detecção destas situações será através da manutenção da palpação e/ou incisão como *follow up* da inspeção visual, sempre que sejam observadas anomalias relevantes (EFSA 2011a).

No sentido de detetar as doenças, o MVO deve direcionar a sua atenção para áreas onde estas são mais suscetíveis de serem observadas. As lesões resultantes de doença podem ocorrer em qualquer localização da carcaça e órgãos, no entanto estas são mais frequentemente visíveis e palpáveis em locais específicos. No que respeita à detecção organolética da doença, o sistema linfático assume uma importância relevante e sua incisão, tal como a de outros órgãos permite a observação detalhada do seu parênquima e eventuais alterações presentes. Assim, e como se verifica no método de inspeção atual, os g.l. devem ser seccionados em duas metades iguais de modo a expor o seu interior (USDA 2012; Regulamento CE nº854/2004). As lesões que se traduzem numa necrose caseosa indicativa de uma possível infeção por micobactéria são expostas desta forma, não sendo detetadas na ausência de incisão (figuras X e XI) (EFSA 2011a;

USDA 2012; Hiller *et al.* 2013). As linfadenites granulomatosas dos suínos são habitualmente destituídas de sinais clínicos, sendo detetadas somente durante a inspeção sanitária *post mortem* (Morés & Silva 2001; Eisenberg *et al.* 2012). Em Portugal, esta ocorrência foi descrita pela primeira vez no final de 2004, tendo sido classificada como surto, dado o número elevado de animais afetados (Baptista *et al.* 2005; Domingos *et al.* 2008). As lesões macroscópicas mais frequentemente observadas nos g.l. consistiam em hipertrofia evidenciando, ao corte, múltiplos granulomas de aspeto necrótico e calcificado. Nos casos em que os gânglios não apresentavam

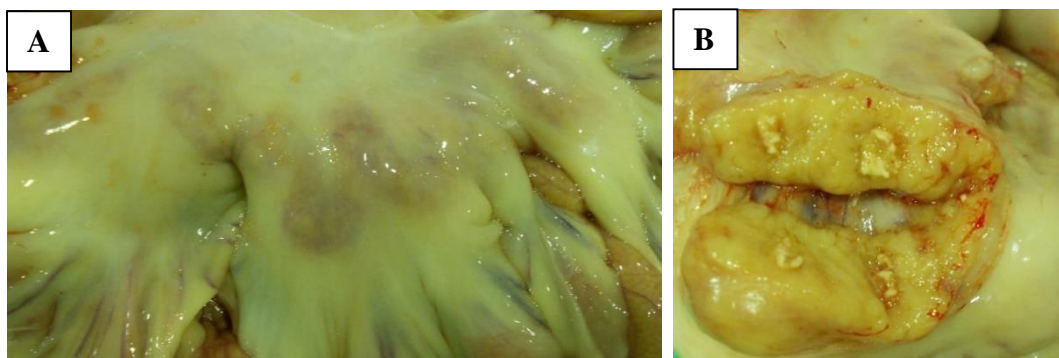


Figura X. A: Gânglios linfáticos mesentéricos sem alterações significativas na superfície externa; B: Gânglios linfáticos mesentéricos apresentando ao corte múltiplos focos de necrose

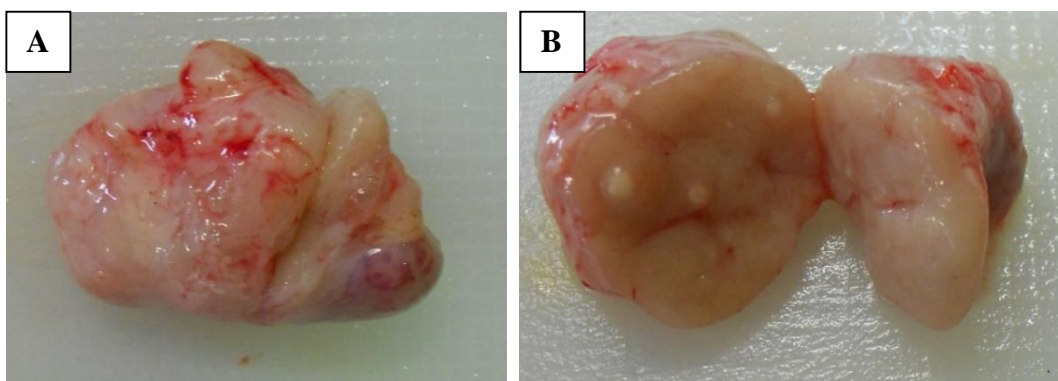


Figura XI. A: Gânglios linfáticos mandibulares sem alterações significativas na superfície externa; B: Gânglios linfáticos mandibulares apresentando ao corte 3 focos de necrose

alterações significativas de tamanho era, também, recorrente a visualização de pequenos focos de necrose, após incisão dos mesmos (Baptista *et al.* 2005). Um estudo realizado na Lituânia demonstrou que suínos clinicamente saudáveis revelaram, à incisão dos respetivos gânglios, pequenos focos caseosos e esbranquiçados, de poucos milímetros de diâmetro, quando os mesmos se encontravam aparentemente sem quaisquer alterações na sua superfície externa (Agdestein *et al.* 2011). Logo, no caso particular de infeção por *Mycobacterium* spp., a inspeção *post mortem* não pode ser preconizada como *follow up* da inspeção visual (nem *ante-mortem*). O método de inspeção *post mortem* atual envolve a inspeção da cabeça, vísceras e carcaça. Os focos primários de infeção por *Mycobacterium* spp. são normalmente os g.l. que drenam o sistema digestivo, nomeadamente os mandibulares e os mesentéricos, em suínos (Eisenberg *et al.*

2012; Silva 2012; USDA 2012; Morés & Silva 2001; Eisenberg *et al.* 2012). Segundo o Regulamento CE n° 854/2004, é obrigatória a incisão dos gânglios mandibulares e a inspeção visual, palpação e, se necessário, incisão dos gânglios mesentéricos nestes animais, durante a inspeção *post mortem*. O principal objetivo deste exame é detetar lesões, tal como qualquer vestígio de necrose caseosa que possa indicar uma possível infeção (Hiller *et al.* 2013). Como já referido, os critérios de decisão sanitária de suínos com lesões ganglionares granulomatosas compatíveis com infeção por *Mycobacterium avium* spp., deverão ser realizados de acordo com a Circular n° 232/G de 2005 e com o Regulamento (CE) n.º 854/2004.

Na sequência da aplicação do parecer da EFSA, se a palpação e incisão dos g.l. deixar de ser praticada de forma sistemática, estas lesões deixarão de ser detetadas e as carcaças serão aprovadas, apesar de insalubres e impróprias para consumo humano. Além disso, é defendido por Hamilton *et al.* (2002) que o efeito da omissão desses cortes, na diminuição da contaminação cruzada de carcaças com *Salmonella* spp./ *Yersinia enterocolitica* poderá não ser tão significativo sob o ponto de vista estatístico porque os operadores do matadouro também tocam inevitavelmente nas carcaças, ao desenvolverem as operações do abate, nomeadamente a evisceração.

É afirmado pela EFSA (2011a) que as lesões decorrentes da infeção por micobactérias, em suínos, são raras e que quando são observadas alterações ao nível dos g.l. estas têm como causa outros microrganismos que não as micobactérias, não representando portanto um risco para a segurança alimentar. Contudo, um estudo na Holanda revelou que cerca de 50% dos 402 gânglios com lesões analisados continham *M.avium* spp. (Alban *et al.* 2008). Na Lituânia, *M. avium* spp. foi isolado de 11 gânglios colhidos de 10 suínos, de uma exploração afetada (Agdestein *et al.* 2011). Segundo Baptista *et al.* 2005, o agente responsável pelo surto em 2004 foi identificado, por técnicas de biologia molecular, como sendo o *M.avium* subsp. *hominissuis*. Domingos *et al.* (2008) refere, ainda, que no decurso de um estudo feito em suínos com linfadenite, em Portugal, mais de 86% dos isolados de lesões granulomatosas suspeitas em porcos foram identificados pelo método de PCR como pertencendo a *M.avium* subsp. *hominissuis*.

3.4 Riscos emergentes ou re-emergentes

Como referido, a infeção por *Mycobacterium* spp. pode ser detetada através do exame *post mortem* das carcaças de suínos (Hiller *et al.* 2013; Morés & Silva 2001; Eisenberg *et al.* 2012). No entanto, tem sido mantida sob controlo em muitas áreas devido aos modernos sistemas de

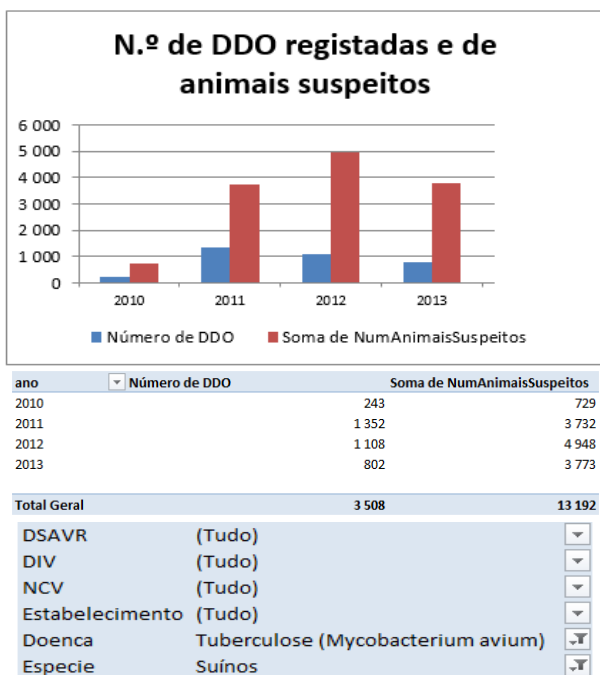


Figura XII. Número de DDO comunicadas e de animais suspeitos de infecção por *M. avium* spp., no ano de 2010, 2011, 2012 e 2013 (DGAV 2013)

produção pecuária e de cuidados de saúde animal que foram, entretanto, introduzidos, segundo a EFSA (2011a). Assim, a capacidade do atual sistema de inspeção *post mortem* de carnes para detetar lesões causadas por micobactérias é apenas relevante em regiões onde esta está presente (EFSA, 2011a). Consideramos que este é o caso de Portugal, onde todos os dias são elaboradas inúmeras DDO (802 DDO em 2013; figura XII), indicativas de animais suspeitos de infecção por este agente. Outros dos principais objetivos da alteração aos métodos de inspeção de carnes consiste em obter um quadro de segurança alimentar flexível, baseado no risco e adaptável às mais variadas situações que ocorrem na prática. De acordo com tal, se o risco associado aos perigos considerados, pela EFSA (2011a) como mais preocupantes, diminuir ao longo do tempo, será lógico esperar que toda a atenção seja redirecionada para outros perigos que se possam tornar cada vez mais relevantes, considerando que estes podem variar ao longo dos anos, bem como entre diferentes áreas geográficas e tipos de produção (Alban *et al.* 2008). Como exemplos deste panorama, podemos considerar a emergência de um novo perigo que possa colocar em risco a segurança alimentar das carnes, ou o aumento do risco, ao longo do tempo ou em algumas regiões, associado a perigos que já existem e que presentemente não eram considerados prioritários (EFSA 2011a). É essencial que em associação com o quadro de segurança proposto sejam usados sistemas de monitorização das doenças consideradas relevantes, acompanhados de mecanismos de alerta de riscos emergentes. O conhecimento dos dados epidemiológicos dos agentes e a incidência de casos clínicos causados no Homem, por cada área/país, são essenciais para a atualização constante da classificação do risco associado a determinado perigo (EFSA 2011a). As micobacterioses poderão ser o exemplo de um caso de baixa prioridade a nível europeu, mas em algumas regiões, como Portugal, tem ocorrido um aumento de incidência como se verifica desde 2010 até 2012, através do aumento do número de animais portadores suspeitos de *Mycobacterium avium* spp. e correspondente aumento no número de DDO comunicadas (figura XII). Em 2012 verificou-se uma prevalência de 0,11% (Anexo V) tendo esta diminuído em 2013

para 0,09%, provavelmente devido ao menor número de suínos abatidos neste ano (figura VII e VIII). Especialmente, a Região Centro apresentou no ano de 2012 uma prevalência de 0,66% (Anexo V), tendo aumentado esta prevalência no ano de 2013 para 0,75% (figura VII e VIII), apesar da diminuição verificada no número de animais abatidos. Também a Alemanha, segundo Möbius *et al.* (2006), sofreu um aumento na frequência de infeções causadas por *M.avium* spp. após a tuberculose bovina ter sido erradicada.

O aumento da incidência de interações entre o Homem e as micobactérias é previsível em anos futuros, tendo em conta o aumento de casos clínicos atribuídos a MNT (Biet *et al.* 2005; Twamoto *et al.* 2012; Lara *et al.* 2011). Os agentes MAC, em particular, parecem ser também mais resistentes, comparativamente a outros patogêneos, aos tratamentos à água com cloro e à ação dos antibióticos usados no controlo da doença. (Sánchez 2009; Biet *et al.* 2005; Starkova *et al.* 2013). Este aumento de incidência tem em conta, de igual forma, o aumento da percentagem de infeções por micobactérias em populações com características que as predispõem a tal, tais como imunodepressão ou submissão a tratamentos imunossupressivos, idade avançada, bem como fatores de ordem socioeconómica (Sánchez 2009; Biet *et al.* 2005).

3.5 Comparação do método atual e do método proposto de inspeção sanitária em suíno

Numerosos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os sistemas de inspeção *post mortem* atual e proposto (apenas visual), em suínos abatidos (Alban *et al.* 2008; EFSA 2011a). Estes estudos têm-se focado mais nas alterações organoléticas do que nos agentes etiológicos em si (EFSA 2011a). Na Dinamarca, um estudo comparativo da frequência de lesões, detetadas pelo método de inspeção visual e tradicional em suínos abatidos foi conduzido durante 6 meses (Mousing *et al.* 1997). Este estudo incluiu 183 383 suínos que foram primariamente sujeitos a inspeção visual e só depois ao método de inspeção tradicional (incisão e palpação), por 2 equipas de inspeção diferentes. Concluiu-se que o método de inspeção, apenas visual se encontra associado a altas taxas de não deteções para todas as classes de lesões, incluindo aquelas detetáveis visualmente em ambos os sistemas de inspeção, como por exemplo, a pleurite crónica (Mousing *et al.* 1997). Na Austrália, também se compararam estes dois métodos, durante cerca de 12 meses, concluindo no final que o método de inspeção proposto pela EFSA estava associado à não deteção de anomalias grosseiramente detetáveis, tais como abscessos, artrites, pleurites, bursites, dermatites e com a não deteção dos g.l. reativos,

nomeadamente os g.l. mandibulares e inguinais superficiais contrariamente ao que se verifica com os métodos em vigor (Hamilton *et al.* 2002).

Conclusão e perspetivas futuras

A realização deste estágio permitiu aprofundar e consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo da minha formação académica a nível teórico mas, principalmente, a nível prático. Foi enriquecedor conhecer o papel e as funções que este departamento da DGAV desempenha na salvaguarda da saúde pública e animal, por meio de um conjunto de profissionais cuja atuação é sempre multidisciplinar. O fato do estágio ter englobado a passagem por vários estabelecimentos de abate, por grandes empresas e pela lota de Aveiro e por ter permitido a aproximação às funções e decisões sanitárias tomadas por vários MVO, em diferentes contextos profissionais, permitiu-me experimentar as diferentes metodologias adotadas por estes e desenvolver as “ferramentas” necessárias ao desempenho desta profissão.

Na inspeção sanitária, um exame macroscópico detalhado e sistemático permite a obtenção do diagnóstico e a aplicação da decisão sanitária adequada, na grande maioria dos casos. Todavia, existem lesões em que o apoio laboratorial se torna indispensável. Na linfadenite granulomatosa suína a técnica de coloração de ZN constitui um método simples e rápido mas pouco sensível para baixas densidades de colonização de micobactérias, apresentando resultados pouco conclusivos. É crucial, nestas situações, o recurso a exames bacteriológicos mais detalhados para uma correta identificação dos agentes etiológicos envolvidos. Apesar do exame cultural ser uma técnica demorada, dadas as exigências do crescimento das micobactérias, constatou-se o crescimento de colónias em 51% das culturas efetuadas, correspondentes às amostras recolhidas entre janeiro e fevereiro de 2013 e, mais recentemente, em 24% das culturas efetuadas, correspondentes aos gânglios recolhidos entre setembro e dezembro de 2013 e até ao momento processados.

O diagnóstico etiológico das lesões granulomatosas dos g.l. do trato digestivo é essencial para a aplicação correta da decisão sanitária, pelo MVO, de forma a não pôr em risco a segurança alimentar e a saúde pública, mas também a não prejudicar o produtor. Em Portugal, a Autoridade Veterinária Nacional considera que as lesões observadas, ao nível dos g.l. mandibulares e mesentéricos, se devem exclusivamente a bactérias do MAC, mais especificamente a *M.avium* spp., declarando mais recentemente apenas a doença e classificando-a como LTS, não encaminhando para o INIAV qualquer material. Desta forma, a situação real da doença no nosso país não é conhecida.

Mediante a aplicação do teste GenoType Mycobacterium CM foi possível determinar que a espécie de micobactéria envolvida nas lesões granulomatosas de 51% dos g.l., recolhidos na fase inicial deste projeto, era o *M.avium* spp.. Os resultados laboratoriais são essenciais para concluir que está a ser feita uma correta notificação de uma das explorações de suínos como sendo portadora de LTS.

A presença e a distribuição de várias IS nas subespécies de *M.avium* spp. tem permitido definir as diferenças entre estas bem como desenvolver métodos de biologia molecular com suficiente poder discriminatório para as isolar e diferenciar. Neste sentido, a técnica de PCR “multiplex” revelou-se um método rápido e preciso na identificação da subespécie Mah, em 100% das amostras testadas, correspondentes a 24 g.l. recolhidos para estudo. Muwonge *et al.* (2012), Domingos *et al.* (2009) e Eisenberg *et al.* (2012) reforçam estes resultados, referindo a presença de Mah em 78%, 86,2% e 98% dos isolados de *M.avium* spp. de suínos, respetivamente.

Rindi & Garzelli (2014) constataram que pacientes imunocomprometidos desenvolvem, na sua grande maioria, infeções causadas por Mah. Além disso, Iwamoto *et al.* (2012) reforça que a nível europeu existe um elevado grau de similaridade entre as estirpes de Mah de humanos e suínos, sugerindo uma fonte comum de infeção ou uma possível transmissão do agente destes animais para o Homem. Desta forma, sendo o agente *M.avium* spp., e mais especificamente a subespécie Mah, um problema de saúde pública importante e sobre o qual tem aumentado a preocupação internacional devido à sua patogenicidade, tanto para o Homem como para os suínos, torna-se relevante avaliar os eventuais efeitos que as mudanças, sugeridas pela EFSA, no atual método de inspeção de suínos, possam ter na sua deteção. Assim, o parecer da EFSA parece não ter em conta muitas das diferenças inerentes aos diferentes países da UE como o tipo de produção animal, as doenças animais e do Homem, os sistemas de vigilância de saúde humana, veterinária e ambiental, os sistemas de combate às doenças, entre outros, de forma a concluir com segurança que este agente não representa um risco. Contudo, pelo menos em Portugal, a IRCA não pode no momento atual servir de “pilar” a este parecer, por todas as irregularidades que lhe estão subjacentes e que não contribuem para a categorização, em termos de risco, do lote dos animais que chegam para abate. No *post mortem* as medidas preventivas deveriam ser focadas nos operadores do abate pois, no decurso da sua função, contribuem largamente para a contaminação cruzada das carnes, mesmo antes do MVO proceder à inspeção das mesmas. Além disso, os métodos de inspeção propostos parecem ser menos eficazes na deteção de todo o tipo de lesões. Neste sentido, alterações nos atuais métodos de inspeção poderão representar não só o aumento do risco associado ao agente *Mycobacterium* spp., que até

agora não é considerado prioritário, como também a emergência de outros perigos relevantes em saúde pública.

Para a continuidade deste estudo, será preponderante a aplicação das técnicas laboratoriais descritas e outras se considerado relevante, às restantes 115 amostras, recolhidas entre setembro e dezembro, e que até agora não foram processadas, de forma a reforçar o número de amostras confirmadas com Mah e a possibilitar uma futura comparação com o agente presente em amostras humanas. Com este trabalho pretendeu-se contribuir para um conhecimento da distribuição e da relevância do *M.avium* spp. em suínos nacionais, relacionando-o com a sua importância em saúde pública.

Perspetiva-se proximamente, e apesar de Slana *et al.* (2010) referir que são poucos os relatos feitos sobre a identificação de espécies pertencentes ao MAC diretamente do tecido infetado, sem cultura prévia, a aplicação da técnica de PCR diretamente às nossas amostras, com o objetivo de confirmar a presença de micobactérias de uma forma fácil e rápida, assim como de identificar a subespécie, permitindo um diagnóstico num menor período de tempo possível.

Comunicações submetidas:

IJUP- Investigação Jovem UP 12-14 de fevereiro de 2014 (*poster*)

“One Health: MAC granulomatous lesions in slaughtered swine as a public health problem”. A. Gonçalves¹; B. Enguião¹; C. Ferro²; I. Amorim¹; A.Canadas¹; A. Rema¹; F. Gärtner¹; A. Santos Silva²; J. Correia da Costa^{2,3}, E. Gomes Neves^{1,3}

¹ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto;²National Reference Laboratory for Mycobacteria, INSA, National Institute of Health, Porto;³CECA-ICETA, Centro de Estudos de Ciência Animal, Universidade do Porto;

SPCV- Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias 3-5 de abril 2014 (comunicação oral)

“Uma só saúde: linfadenite por MAC em suínos de abate - um desafio em termos de diagnóstico, epidemiologia e saúde pública” Gonçalves, A¹; Enguião, B.¹; Ferro, C.²; Amorim, I.¹; Canadas, A.¹; Rema, A.¹; Gärtner, F. ¹; Santos Silva, A.²; J. Correia da Costa, J.M.^{2,3}; Gomes Neves, E. ^{1,3}

¹ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto;

² National Reference Laboratory for Mycobacteria, INSA, National Institute of Health, Porto:

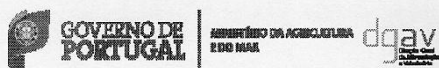
³CECA-ICETA, Centro de Estudos de Ciência Animal, Universidade do Porto

Referências bibliográficas

- Agdestein A, Johansen T, Polacek V, Lium B, Holstad G, Vidanovic D, Aleksic-Kovacevic S, Jorgensen A, Zultauskas J, Nilsen S, Djonne B (2011) "Investigation of an outbreak of mycobacteriosis in pigs" in **BMC Veterinary Research**, 7-63.
- Agdestein A, Johansen TB, Kolbjømsen Ø, Jørgensen A, Djonne B, Olsen I (2012) "A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs" in **BMC Veterinary Research**, 8:11
- Alban L, Vilstrup C, Steenberg B, Jensen HE, Aalbaek B, Thune-Stephensen F, Jensen S (2008) "Assessment of risk for humans associated with Supply Chain Meat Inspection – The Danish Way", 1-34
- Álvarez J, Castellanos E, Romero B, Aranaz A, Bezos J, Rodríguez S, Mateos A, Domínguez L, Juan L (2011) "Epidemiological investigation of a *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* outbreak in swine" in **Epidemiol. Infect.** 139, 143-148
- Baptista R, Monteiro M, Amado A, Albuquerque T e Botelho A (2005) "Linfadenite tuberculosa em suínos (Complexo *Mycobacterium avium*)" in **Revista da Sociedade Científica de Suinicultura** 2, 34-36
- Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA (2005) "Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC)" in **Vet. Research** 36, 411-436
- Charette R, Martineau GP, Pigeon C, Turcotte C, Higgins R (1989) "An outbreak of granulomatous lymphadenitis due to *Mycobacterium avium* in swine" in **Can. Vet. J.**, 675-678
- Circular nº232/G da Direção Geral de Veterinária de 29/07/ 2005
- Decreto-Lei nº 39 209 de 14 de Maio de 1953 in **Diário da República**, 1ª Série, Nº 17, 240-258
- Decreto-Lei nº 85/2012 de 5 de Abril de 2012 in **Diário da República**, 1ª Série, Nº 69, 1745-1759
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) (2013) in <http://extranet.dgav.min-agriculturs.pt>, consultado a 6 de janeiro de 2014
- Domingos M, Amado A, Botelho A (2009) "IS1245 RFLP analysis of strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from pigs with tuberculosis lymphadenitis in Portugal" in **Veterinary Record** 164, 116-120
- European Centre of Disease Prevention and Control (ECDC) (2011) "Relatório epidemiológico anual 2011" in http://www.ecdc.europa.eu/pt/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf, consultado a 15 de janeiro de 2014
- Eisenberg T, Volmer R, Eskens U, Moser L, Nesseler A, Sawyerwald C, Seeger H, Klemer-Fromentin K, Möbius P (2012) "Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*" in **Veterinary Microbiology** 159, 69-76
- Enguião BD (2013) "Tarefas do Médico Veterinário Oficial e Linfadenite Tuberculosa Suína" in **Relatório Final de Estágio**, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, UP
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011a) "Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine)" in **EFSA Journal**, 9(10):2351
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011b) "Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for public health hazards to be covered by meat inspection of swine" in **EFSA Journal**, 9(10):2371
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012) "Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry)" in **EFSA Journal**, 10(6):2741
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013a) "Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (solipeds)" in **EFSA Journal**, 11(6):3263
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013b) "Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from farmed game" in **EFSA Journal**, 11(6):3264
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013c) "Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from sheep and goats" in **EFSA Journal**, 11(6):3265
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013d) "Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (bovine animals)" in **EFSA Journal**, 11(6):3266
- 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" in **Vet. Research**, 39:01
- Gil JI (2005) "Sistema linfático" in **Manual de Inspeção Sanitária de Carnes II**
- Hamilton DR, Gallas P, Lyall L, McOrist S, Hathaway SC, Pointon AM (2002) "Risk-based evaluation of post-mortem inspection procedures for pigs in Australia" in **Vet. Rec.**, 110-116
- Hibiya K, Utsunomiya K, Yoshida T, Toma S, Higa F, Tateyama M, Fujita J (2010) "Pathogenesis of systemic *Mycobacterium avium* infection in pigs through histological analysis of hepatic lesions" in **The Canadian Journal of Veterinary Research** 74, 252-257
- Hiller A, Oorburg D, Wisselink HJ, Solt-Smits CB, Urlings B, Klein G, Althoff GS, Heres L (2013) "Prevalence of *Mycobacterium avium* in Slaughter Pigs Based on Serological Monitoring Results and Bacteriological Validation" in **Int. J. Environ. Res. Public Health** 10, 4027-4038
- Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LEM "The *Mycobacterium avium* Complex" in **Clinical Microbiology Reviews**, 266-310

- Iwamoto T, Nakajima C, Nishiuchi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi N, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y, Nasu M (2012) “Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment” in **Infection, Genetics and Evolution** 12, 846-852
- Käferstein E, Abdussalam M (1999) “Food safety in the 21st century” in **Bulletin of the World Health Organization** 77
- Karadag A, Usta E, Bilgin K, Güney AK, Eroğlu C, Günaydin M “Comparison of culture, Real-Time DNA Amplification Assay and Ehrlich-Ziehl-Neelsen for detection of *Mycobacterium tuberculosis*” in **Balkan Medical Journal** 30, 13-5
- Komijn RE, et al. (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” in **Journal of Clinical Microbiology**, 1254-1259
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1997) “Mycobacteria” in **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology** 5^a edition, 893-930.
- Lara GH, et al. (2011) “Occurrence of *Mycobacterium* spp. And others pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*)” in **Research in Vet. Science** 90, 185-188
- Miranda C, Matos M, Pires I, Ribeiro P, Álvares S, Vieira-Pinto M, Coelho AC (2011) “*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in slaughter domestic pigs for consumption detected by molecular methods” in **Food Research International** 44, 3276-3277
- 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” in **Veterinary Microbiology** 117, 284-291
- Moravkova M, Hložek P, Beran V, Pavlik I, Preziuso S, Cuteri V, Bartos M (2008) “Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues” in **Research in Veterinary Science** 85, 257-264
- Morés N, Silva VS (2001) “Micobacterioses dos suínos – Linfadenite Tuberculóide” in **Embrapa Suínos e Aves**, 55-62
- Mousing J, Kyrval J, Jensen TK, Ålbæk B, Buttenschon B, Willeberg P (1997) “Meat safety consequences of implementing visual inspection procedures in Danish slaughter pigs” in **Vet.Rec.** 140, 472-477
- Muwonge A, Kankya C, Johansen TB, Djonje B, Godfroid J, Biffa B, Edvardsen V, Skjerve E (2012) “Non-tuberculous mycobacteria isolated from slaughter pigs in Mubende district, Uganda” in **BMC Veterinary Research**, 8:52
- Pate, Žolnir-Dovč M, Krt B, Očepek M (2008) “IS1245 RFLP-based genotyping study of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from pigs and humans” in **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Diseases** 31, 537-550
- Regulamento (CE) n° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 in **Jornal Oficial da União Europeia** L226, 83-127
- Regulamento (CE) n° 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 in **Jornal Oficial da União Europeia** L226, 3-21
- Regulamento (CE) n°178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002 in **Jornal Oficial das Comunidades Europeias** L31, 1-24
- Rindi L, Garzelli C (2014) “Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*” in **Infection, Genetics and Evolution** 21, 375-383
- Sánchez JA (2009) “Mycobacteriosis due to members of the *Mycobacterium avium* complex in swine: significance, diagnosis and identification of possible sources of infection” in **Visavet Outreach Journal**
- Schlundt J, Toyofuku H, Jansen J, Herbst SA (2004) “Emerging food-borne zoonoses” in **Rev.Sci.Tech** 23:513-533
- Silva VS (2002) “Micobacteriose suína causada por agentes do Complexo *Mycobacterium avium* (MAC)” in **Embrapa Suínos e Aves**, 20-33
- Slana I, Kaevska M, Kralik P, Horvathova A, Pavlik I (2010) “Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. Hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR” in **Vet.Microbiology** 144 (3-4), 437-443
- Starkova DA, Otten TF, Mokrovsov IV, Vyazovaya AA, Vishnevsky BI, Narvskaya OV (2013) “Genotypic Characteristics of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains” in **Russian Journal of Genetics** 49, 909-914
- Thorel M, Huchzermeyer H, Michel A, (2011) “*Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals” in **Ver.Sci.Off.int.Epiz.** 20(1), 204-218
- Tirkkonen T, Nieminen T, Ali-Vehmast T, Peltoniemi OA, Wellenberg G, Pakarinen J (2013) “Quantification of *Mycobacterium avium* subspecies in pig tissues by real-time quantitative PCR” in **Acta Veterinaria Scandinavica**, 55:26
- United States Department of Agriculture (USDA) (2012) “Animal Disposition/Food Safety: Post-mortem Inspection. Food Safety and Inspection Service” in http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/6d982860-3c8d-4685-8068-6cfff00ae9ec/PHVt-Post_Mortem_Inspection.pdf?MOD=AJPERES, consultado a 2 de dezembro de 2013

Anexo I. Comunicação de uma DDO



MODELO DE COMUNICAÇÃO
DOENÇAS DECLARAÇÃO
OBRIGATÓRIA

COMUNICAÇÃO SUSPEITA DOENÇAS DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA

MATADOURO

Matadouros da Beira Litoral, S. A.

Nº APROVAÇÃO B 92

Nº DDO

Aveiro

Data: 1/2/2013 12:00:00 AM

Para os devidos efeitos, comunica-se que foi nesta data, durante o exame ante/post-mortem, efectivada a suspeita da doença Tuberculose (*Mycobacterium avium*) em animais apresentados para abate neste estabelecimento.

Espécie	Nº Animais Suspeitos
Suínos	6
Nº de animais do lote	Raça
30	hibridos
Código da exploração origem	Idade dos animais
<input type="text"/>	6 meses
Nome do produtor	Morada da exploração
<input type="text"/>	<input type="text"/>
Sinais clínicos observados	
não se observaram quaisquer sinais clínicos	
Lesões macroscópicas observadas	
lesões caseocarcinomas a nível dos linfonodos submandibulares	
Medidas tomadas	
rejeição parcial das cabeças e linguas. rejeição total das vísceras brancas do lote.	

O Inspector Sanitário

Anexo II. Técnicas de descontaminação e homogeneização (adaptado do protocolo adotado no INSA)

Técnicas de descontaminação e homogeneização de produtos biológicos para exame direto e cultural de pesquisa de agentes do gênero *Mycobacterium*.

Método de descontaminação da N-acetil-L-cisteína sódica (método de Kubica – Referência: Kubica G.P. Dye W.E. Cohn M.L. and Middlebrook G. : "sputum digestion and decontamination with N-acetylcystein – sodium hydroxyde for culture of mycobacteria., Am. Ver. Respir. Dis. 1963, 87, 775.

Reagentes:

Sol. 1- Solução de citrato de sódio (2,94 g/100 ml de água)

Sol.2 – Solução de hidróxido de sódio (4 g/100 ml de água)

Sol. 3 – Solução de trabalho – juntar em partes iguais Sol. 1 e Sol. 2; colocar em frascos de 100 ml e autoclavar 15 min., 120°C; adicionar extemporaneamente 0,5 g de N-acetil-L-cisteína a cada 100 ml de mistura.

Tampão de fosfato pH 6,8 – Adicionar em partes iguais:

Solução NaHPO_4 anidro (9,47 g/1000 ml de água dest.)

Solução KH_2PO_4 anidro (9,07 g/1000 ml de água dest.)

Autoclavar 15 min., 120°C.

Técnica:

- 1- Num frasco cônico de 50 ml colocar 4 ml de Sol. 3
- 2- Adicionar a amostra de produto (~3 mL de expetoração, suco gástrico, secreções brônquicas e lavados brônquicos ou broncoalveolar concentrados por centrifugação)
- 3- Agitar em vortex durante 20 seg.
- 4- Agitar suavemente durante 20 min., à temperatura ambiente. Completar até ao volume final com tampão de fosfato.
- 5- Centrifugar a 3000g durante 15 min.
- 6- Decantar o sobrenadante. Fazer o esfregaço com 1 gota de sedimento.
- 7- Reconstituir com tampão de fosfato ou albumina bovina (~1 ml) e inocular os meios de cultura.

Anexo III. Extração de DNA e Amplificação – teste GenoType Mycobacterium CM (protocolo adotado no INSA)

Extracção de ADN

Podem ser usadas bactérias cultivadas em placas de cultura (ex. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) ou em meio líquido (ex. BACTEC, MB-Check). O teste não pode ser usado para detectar micobactérias directamente a partir do material do paciente. A área de trabalho tem que estar livre de ADN amplificado. É crucial aquecer as amostras a 95°C por, pelo menos, 20 minutos de forma a inactivar as bactérias vegetativas. Poderá ser usado qualquer procedimento de extracção de ADN desde que produza ADN amplificável de bactérias. O seguinte protocolo rápido produz, normalmente, ADN adequado para amplificação:

- 1a. Ao usar bactérias cultivadas em meio sólido, colher as bactérias com uma ansa de inoculação e suspender em aproximadamente 300 µl de água (para uso em biologia molecular).
- 1b. Ao usar bactérias cultivadas em meio líquido, aplicar directamente 1 ml. Precipitaras bactérias centrifugando, a aproximadamente 10000 x g durante 15 min, numa centrífuga de bancada normal com um rotor estanque a aerossóis, numa câmara da segurança da classe II. Descartar o sobrenadante e ressuspender as bactérias em 100-300 µl de água (ver acima) fazendo vortex.
2. Incubar as bactérias dos passos 1a ou 1b durante 20 min a 95°C num banho de água.
3. Incubar durante 15 min num banho ultrasónico.
4. Centrifugar durante 5 min à velocidade máxima e usar 5 µl do sobrenadante para a PCR. No caso de a solução de ADN ser para armazenar durante um período longo, transferir o sobrenadante para um novo tubo.

Os protocolos detalhados podem ser solicitados a partir do distribuidor local ou através de: www.hain-lifescience.com

Amplificação

Preparar a mistura de amplificação (45 µl) numa sala livre de ADN. A amostra de ADN deve ser adicionada numa área separada.

Mistura por tubo:

- 35 µl de PNM – fornecida com o kit
- 5 µl de tampão de PCR 10x – não fornecido
- x µl de solução de MgCl₂¹¹ – não fornecida
- 1-2 unidades de ADN polimerase termoestável (consultar o manual) – não fornecida
- y µl de água para obter um volume de 45 µl (não considerando o volume de enzima) – não fornecida
- Adicione 5 µl de solução de ADN (20-100 ng de ADN), levando a um volume final de 50 µl (não considerando o volume da enzima).

¹¹ Dependendo do sistema enzima/tampão usado, a concentração óptima de MgCl₂ pode variar entre 1,5 e 2,5 mM. Note, por favor, que alguns tampões de incubação já possuem MgCl₂.

A avaliação do desempenho do ensaio **GenoType Mycobacterium CM** foi realizado com a HotStarTaq DNA Polymerase da Qiagen. Quando usar esta enzima, são necessárias as seguintes quantidades por amostra:

- 35 µl de PNM – fornecida com o kit
- 5 µl de 10x Tampão de PCR Buffer para HotStarTaq (contém 15 mM MgCl₂) – não fornecido
- 2 µl 25 mM de solução de MgCl₂ – não fornecida
- 0,2 µl (1 U) HotStarTaq – não fornecida
- 3 µl de água (para uso em biologia molecular) – não fornecida
- 5 µl de solução de ADN (adicione numa área separada).

A concentração final de MgCl₂ nesta mistura de amplificação é de 2,5 mM.

Determine o número de amostras a ser amplificadas (número de amostras a ser analisadas mais as amostras controlo). Uma amostra de controlo de contaminação, por exemplo, contém 5 µl de água em vez da solução de ADN. Prepare uma "master mix" contendo todos os reagentes excepto a solução de ADN e misture bem (não use o vortex). Faça alíquotas de 45 µl para tubos de PCR.

Anexo III. Amplificação – teste GenoType Mycobacterium CM (protocolo adotado no INSA)

Programa de amplificação²¹:

15 min 95°C	1 ciclo
30 sec 95°C	} 10 ciclos
2 min 58°C	
25 sec 95°C	} 20 ciclos
40 sec 53°C	
40 sec 70°C	
8 min 70°C	1 ciclo

²¹ Aplica-se à Taq polimerase usada para validação. Com algumas ADN polimerases do tipo "hot start", o intervalo de tempo deste primeiro passo pode ter que ser reduzido (consultar, por favor, o manual da enzima).

Os produtos de amplificação poderão ser armazenados de +8 a -20°C. Para verificar a reacção de amplificação, 5 µl de cada amostra poderão ser directamente aplicados num gel de agarose 2% sem adição de "loading buffer". Os amplicons têm um tamanho de aproximadamente 230 pb (Controlo do Género) e de 200 pb (Controlo Universal/fragmentos específicos das espécies), respectivamente.

Anexo III. Hibridização – teste GenoType Mycobacterium CM (protocolo adotado no INSA)

Hibridização

Preparação

Pré-aqueça o banho de água com agitação/TwinCubator a 45°C; o desvio máximo tolerado em relação à temperatura alvo é de +/-1°C. Pré-aqueça as soluções HYB e STR a 37-45°C antes de as usar. Os reagentes têm que estar livres de precipitados (note, no entanto, que a solução CON-D é opaca). Misture se necessário. Aqueça os restantes reagentes, com excepção do CON-C e do SUB-C, à temperatura ambiente. Usando um tubo adequado, dilua 1:100 o Conjugado Concentrado (CON-C, laranja) e o Substrato Concentrado (SUB-C, amarelo) com as quantidades necessárias dos respectivos tampões (CON-C com CON-D, SUB-C com SUB-D). Agite bem e deixe estabilizar à temperatura ambiente. Para cada tira, adicione 10 µl de concentrado a 1 ml do tampão respectivo. Dilua o CON-C antes de cada utilização. O SUB-C diluído é estável durante 4 semanas se armazenado à temperatura ambiente e protegido da luz.

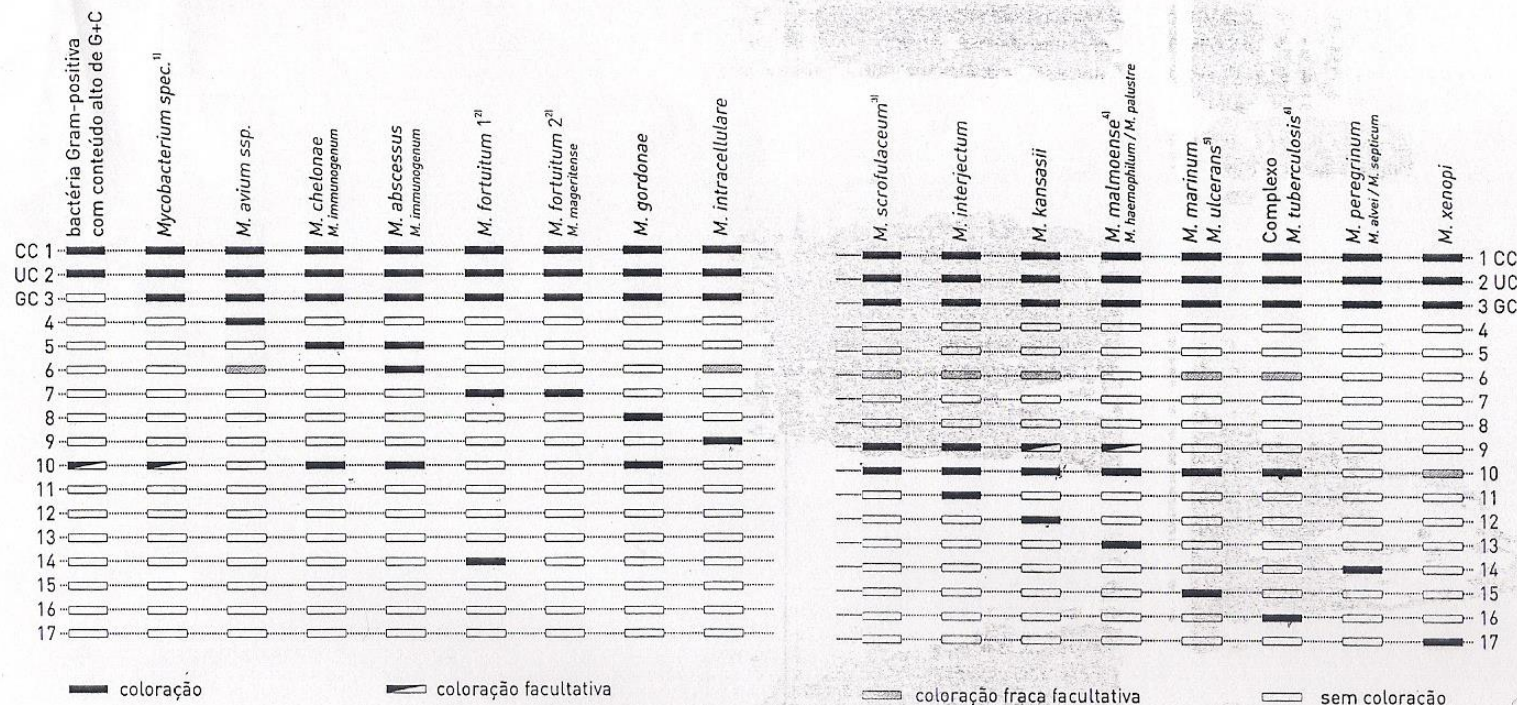
1. Dispense 20 µl da Solução de Desnaturação (DEN, azul) num canto de cada um dos poços usados.
2. Adicione à solução 20 µl da amostra amplificada, com a pipeta aspire e dispense para misturar bem e incube à temperatura ambiente durante 5 minutos. Entretanto, retire as tiras do tubo, usando uma pinça, e marque-as com um lápis abaixo do marcador colorido. Use sempre luvas quando está a manusear as tiras.
3. Cuidadosamente, adicione a cada poço 1 ml de Tampão de Hibridização (HYB, verde) pré aquecido. Agite suavemente a tina até que a solução adquira uma cor homogênea. Tenha cuidado para não salpicar solução para os poços vizinhos.
4. Coloque uma tira em cada poço. As tiras têm que ficar completamente imersas na solução e com o lado revestido pelas sondas (identificável pela marcador colorido perto da extremidade inferior) virado para cima. Usando pinças, volte as tiras que poderão ter ficado com a face referida voltada para baixo aquando da imersão na solução. Limpe cuidadosamente as pinças depois de cada utilização para evitar contaminação. O mesmo se aplica aos passos seguintes.
5. Coloque a tina num banho de água com agitação/TwinCubator e incube durante 30 minutos a 45°C.

Ajuste a frequência da agitação de maneira a obter uma mistura constante e completa da solução. Para permitir uma transferência de calor adequada, a tina tem que ser imersa na água até, pelo menos, 1/3 da sua altura.

6. **Aspire completamente o Tampão de Hibridização.** Use, por exemplo, uma pipeta Pasteur ligada a uma bomba de vácuo.
7. **Adicione 1 ml de Solução de Lavagem Adstringente (STR, vermelho) a cada tira e incube durante 15 minutos a 45°C num banho de água com agitação/TwinCubator.**
8. **A partir deste passo, trabalhe à temperatura ambiente.** **Remova completamente a Solução de Lavagem Adstringente.** Rejeite a Solução de Lavagem para um contentor e remova todos os fluidos remanescentes, voltando ao contrário a tina e colocando-a sobre papel absorvente. Este procedimento também se aplica a todos os outros passos de lavagem.
9. **Lave cada tira uma vez com 1 ml de Solução Rinse (RIN) durante 1 minuto numa plataforma de agitação/TwinCubator (rejeite o RIN depois da incubação).**
10. **Adicione 1 ml do conjugado diluído (ver acima) a cada tira e incube durante 30 minutos numa plataforma de agitação/TwinCubator.**
11. **Remova a solução e lave cada tira duas vezes, durante 1 minuto, com 1 ml de Solução Rinse (RIN) e uma vez, durante 1 minuto, com aproximadamente 1 ml de água destilada (ex., use uma garrafa de lavagem) numa plataforma de agitação/TwinCubator (rejeite a solução em cada lavagem).** Assegure-se que remove quaisquer vestígios de água depois da última lavagem.
12. **Adicione 1 ml de substrato diluído (ver acima) a cada tira e incube no escuro sem agitação.** Dependendo das condições do teste (por ex., temperatura ambiente), o tempo de incubação do substrato pode variar entre 3 e 20 minutos. Um alongamento dos tempos de incubação do substrato pode levar a um aumento do ruído da coloração de fundo, o que pode impossibilitar a interpretação dos resultados.
13. **Pare a reacção enxaguando brevemente por duas vezes com água destilada.**
14. **Usando pinças, remova as tiras da tina e seque-as entre duas camadas de papel absorvente.**

Anexo III. Tabela de Interpretação – teste GenoType Mycobacterium CM (protocolo adotado no INSA)

Tabela de Interpretação



Banda N.º 1 (CC): Controlo do Conjugado

Banda N.º 2 (UC): Controlo Universal

Banda N.º 3 (GC): Controlo do Género

¹⁾ Certas espécies podem eventualmente ser diferenciadas à ajuda do teste **Geno-Type Mycobacterium AS**.

²⁾ Devido a variações na região da sonda o *M. fortuitum* pode ser dividido em dois grupos.

³⁾ *M. "paraffinicum"* e *M. parascrofulaceum* mostram o mesmo padrão de bandas que *M. scrofulaceum*.

⁴⁾ *M. nebraskense* mostra o mesmo padrão de bandas. *M. haemophilum* pode ser identificado pelo teste **GenoType Mycobacterium AS**.

⁵⁾ *M. ulcerans* pode ser identificado pelo teste **GenoType Mycobacterium AS**.

⁶⁾ Para um differentiation mais adicional use o teste **GenoType MTBC**.

Anexo IV. IRCA de uma exploração com casos antecedentes de LTS

Nº [redacted] /2013

DECLARAÇÃO DO OPERADOR DO SECTOR PRIMÁRIO/CRIADOR DE SUÍNOS
INFORMAÇÃO RELATIVA À CADEIA ALIMENTAR⁽¹⁾

1. Identificação do Fornecedor(Exploração/Centro de Agrupamento): [redacted]

Nome: [redacted]	Marca: [redacted]
Localização: [redacted] REGUEIRA DE PONTES	Tel: [redacted]
Caracterização da Exploração: ENGORDA	NIF: [redacted]

2. Identificação dos Animais:

Marca(s) de exploração que os animais ostentam: [redacted]	
Identificação do efectivo, Lote ou pavilhão: [redacted]	Número Total de animais: 80

3. Matadouro de destino (incluir n.º controlo veterinário) ou Centro Agrupamento de Suínos (incluir marca)

MAT. BEIRA LITORAL	PT: B92 CE
---------------------------	-------------------

4. Guia Transporte n.º

Data saída exploração,	18-12-2013
------------------------	-------------------

5. Identificação do Médico Veterinário assistente da exploração de proveniência:

Nome: [redacted]	N.º Carteira Profissional: [redacted]
Endereço: [redacted]	Telefone: [redacted]

6. Estatuto sanitário dos animais, da exploração e/ou estatuto regional⁽²⁾:

A2

7. Medicamentos e outros produtos de uso veterinário administrados aos animais^(*):
(Identificar os produtos de administração, data de administração e intervalos de segurança)

Conforme plano profiláctico e respeitando os intervalos de segurança legais
--

8. Ocorrência de doenças⁽²⁾:

Nada de relevante para a saúde pública

9. Exames executados para diagnóstico de doenças ou no âmbito de vigilância e controlo de zoonoses e resíduos⁽²⁾:

Nada de relevante a assinalar

10. Informação sobre relatórios e inspecção ante-mortem e post-mortem em animais provenientes da mesma exploração incluindo relatórios do veterinário oficial⁽²⁾:

[redacted]

Declaro que as informações constantes nesta declaração são verídicas

Nome: [redacted]	Data: 18-12-2013
------------------	-------------------------

[redacted]
.....
(Assinatura e carimbo)

⁽¹⁾ Informação ao abrigo dos Regulamentos N.º852/2004 ambos de 29 de Abril e do Regulamento N.º 2074/2005 de 5 de Dezembro, deve ser enviada ao matadouro até 24 horas antes do abate ou acompanhar os animais para abate desde que se verifiquem as condições previstas
⁽²⁾ Anexar informação se necessário

234305131

Anexo V. Número de animais abatidos e de animais suspeitos de infeção por *M.avium* spp. em 2012, em Portugal (DGAV 2013)

Número de animais abatidos em 2012

DSVR	(Tudo)	▼
DIV	(Tudo)	▼
NCV	(Tudo)	▼
Estabelecimento	(Tudo)	▼
mes	(Tudo)	▼

Rótulos de Linha ▼ Volume de abate regular

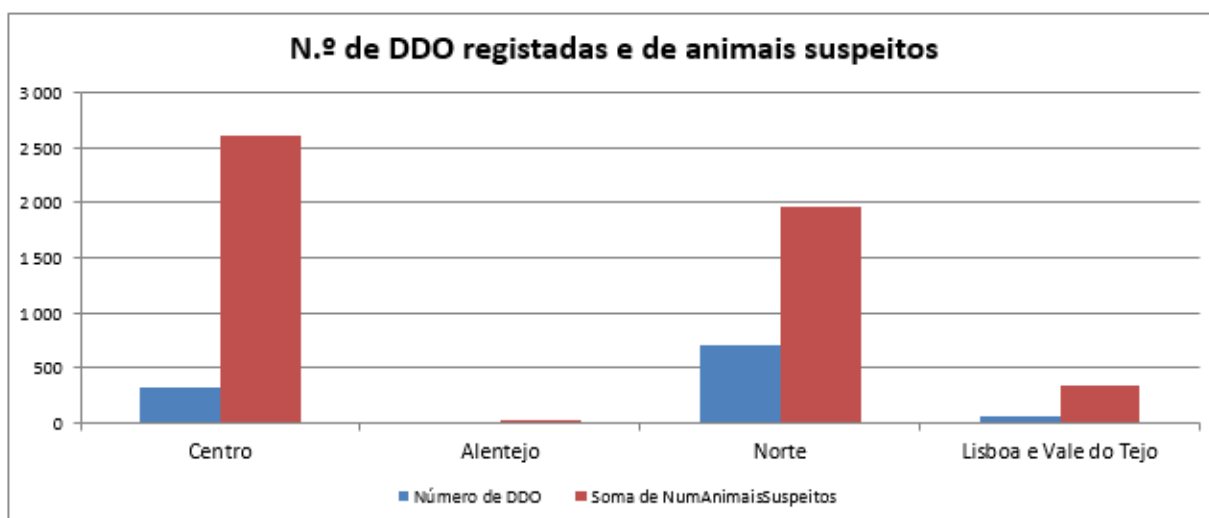
Suínos 4 476 903

Número de animais abatidos em 2012

DSVR	DSVR Centro	▼
DIV	(Tudo)	▼
NCV	(Tudo)	▼
Estabelecimento	(Tudo)	▼
mes	(Itens múltiplos)	▼

Rótulos de Linha ▼ Volume de abate regular

Suínos 395 079



Doença	Tuberculose (Mycobacterium avium)	▼
ano	2012	▼
Especie	Suínos	▼

DSAVR	Número de DDO	Soma de NumAnimaisSuspeitos
Centro	333	2 604
Alentejo	3	26
Norte	710	1 971
Lisboa e Vale do Tejo	62	347
Total Geral	1 108	4 948