

CAPÍTULO 5.1

Otimização de técnica de descontaminação seletiva para isolamento de micobactérias a partir de amostras de cama de suínos

Virgínia Santiago Silva

Beatris Kramer

Arlei Coldebella

Introdução

O sistema de criação de suínos em cama sobreposta favorece a ocorrência de linfadenite granulomatosa, infecção causada por bactérias do Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), acarretando significativo prejuízo econômico para a suinocultura, devido à condenação das carcaças acometidas. A linfadenite granulomatosa é, atualmente, o maior limitante para a adesão do sistema de criação de suínos em cama sobreposta nas regiões de suinocultura intensiva, pois a prevalência dessas lesões é superior nos suínos criados em cama, quando comparados ao sistema convencional (AMARAL et al., 2006).

O papel da cama sobreposta como ambiente favorável à manutenção e/ou multiplicação do agente ainda não está totalmente esclarecido. Os diferentes tipos de substratos, bem como práticas distintas de manejo neste sistema, podem interferir no processo de compostagem da cama e, conseqüentemente, na sobrevivência dos microorganismos ali presentes. Neste contexto, para identificação de alternativas de prevenção e controle de MAC no sistema de cama sobreposta, faz-se necessário o estudo microbiológico do agente neste ambiente.

Entretanto, as pesquisas de micobactérias a partir de espécimens ambientais, como solo, água e cama de suínos, são limitadas pela falta de técnicas eficientes na detecção do agente, pois nestas amostras encontra-se uma quantidade e diversidade de microorganismos que devem ser suprimidos quando se busca a pesquisa específica de *Mycobacterium sp.* O longo tempo de geração das micobactérias patogênicas, e de algumas oportunistas de interesse em saúde pública e animal, resulta em períodos de incubação que podem variar de 21 a 60 dias nos cultivos *in vitro*, dependendo da espécie envolvida. O tempo de incubação, então, é um dos fatores que limita o sucesso da recuperação de micobactérias em amostras de cama de suínos, pois outros microorganismos de crescimento rápido (entre 24 e 48 horas) se difundem nos meios de cultura impedindo o isolamento dos agentes de crescimento lento. Assim, o sucesso da recuperação de *Mycobacterium sp.* partir de espécimens

ambientais depende de processos capazes de eliminar outros microrganismos, preservando seletivamente as micobactérias.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi adaptar e otimizar uma técnica seletiva de descontaminação de amostras de cama para isolamento de micobactérias, com suficiente poder de detecção, para estudos epidemiológicos de MAC no sistema de cama sobreposta.

Resultados e discussão

Ao todo foram testadas 80 variações de técnicas de descontaminação, todas em cinco repetições e cada repetição em triplicata, sendo três tubos de cultivo para cada repetição/técnica. As variações das técnicas foram testadas para maravalha e casca de arroz separadamente, ambas contaminadas experimentalmente com uma amostra padrão de *Mycobacterium avium* sub-espécie *hominisuis*, de origem suína.

As técnicas de descontaminação para cultivo de micobactérias avaliadas foram variações dos métodos de descontaminação de Petroff (método básico) e Löwenstein Jensen (método ácido) modificados, acrescidos de uma etapa com uma solução de cloreto de benzalcônio (ELLSWORTH et al, 1980). As variações do método de Petroff foram combinações de diferentes quantidades de cama processada (3 e 5g), concentração (5 e 10%) e tempo de exposição (20, 25, 30 35 e 40 minutos) ao cloreto de benzalcônio, lavagem do material após a utilização do desinfetante (sim e não), concentração (3 e 4%) e tempo de exposição de hidróxido de sódio (20 e 25 minutos).

Das 80 variações das técnicas de Petroff e Loewenstein Jensen testadas, 46 apresentaram 100% de contaminação nas cinco repetições, 13 apresentaram contaminação \geq seis tubos de cultivo entre os 15 das

cinco repetições e entre as 21 restantes seis apresentaram \geq dois tubos contaminados por repetição da técnica. As 15 técnicas restantes foram avaliadas conforme o número de UFCs de MAC recuperados, considerando-se também a variabilidade entre as repetições dentro das técnicas (repetibilidade). A Figura 1 apresenta o percentual de contaminação por n° de tubos/repetição/técnica, nas 80 variações testadas. A Figura 2 apresenta número de UFC de MAC recuperadas em 15 variações de técnicas de descontaminação, com contaminação \leq cinco tubos nas cinco repetições e recuperação de MAC \geq cinco UFC por técnica.

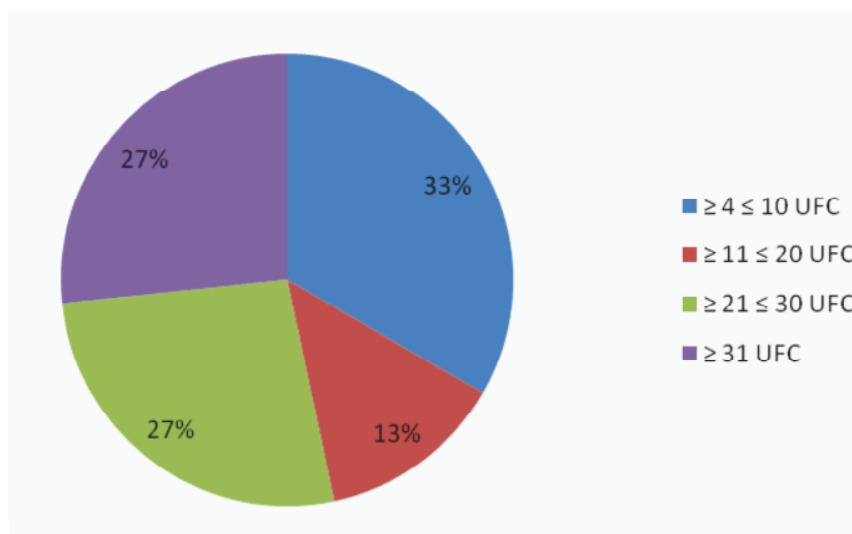


Figura 1. Percentual de contaminação por tubo/técnica, considerando as cinco repetições nas 80 variações testadas

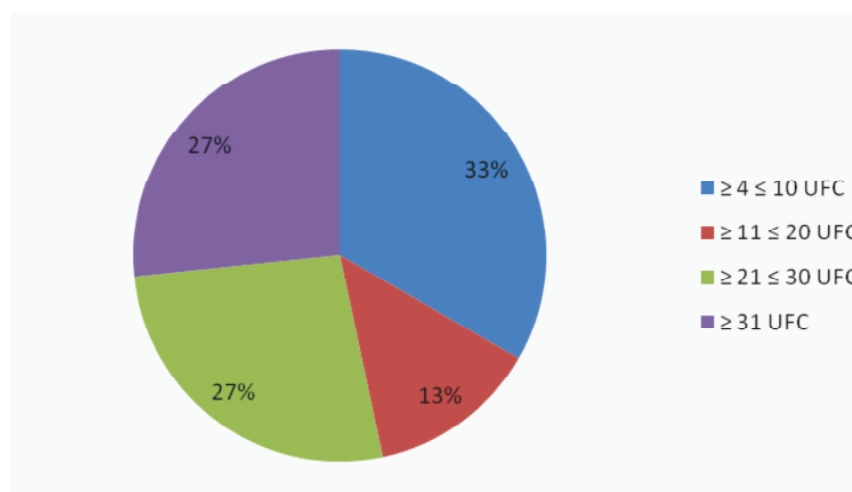


Figura 2. Número de UFC de MAC recuperadas em 15 variações de técnicas de descontaminação, onde obteve-se contaminação \leq cinco tubos nas cinco repetições e recuperação de MAC \geq cinco por técnica

Entre as 15 técnicas mencionadas na Figura 2, quatro (27%) apresentaram nível de descontaminação satisfatório, sendo três com descontaminação total e uma com apenas um tubo contaminado, entre os 15 das cinco repetições em triplicata. Dessas, duas foram aplicadas à maravalha e duas à casca de arroz. A seleção da técnica mais eficiente para cada tipo de cama baseou-se no maior número de UFCs recuperado com menor contaminação.

Houve grande variabilidade entre as cinco repetições em todas as técnicas testadas, entretanto as que apresentaram melhor poder de detecção, ou seja, maior número de isolados/repetição, também apresentaram variabilidade menor entre as repetições.

De maneira geral, a descontaminação seletiva da cama de casca de arroz foi mais difícil do que a maravalha, apresentando maior percentual de contaminações na maioria dos protocolos. Entretanto, os melhores resultados de descontaminação seletiva e número de UFCs recuperado foi obtido pela mesma técnica, para ambos os materiais de cama.

A técnica otimizada apresentou resultados satisfatórios quanto a descontaminação de amostras ambientais para pesquisa de micobactérias, entretanto o caráter quantitativo mostrou-se limitado. A grande variação no número de isolados obtidos em cada repetição da mesma amostra/técnica demonstra a baixa repetibilidade do método, o que restringe sua aplicação para fins quantitativos, como a enumeração de UFCs. Em amostras ambientais, a baixa repetibilidade das análises microbiológicas é um achado frequente, podendo estar associada tanto à técnica laboratorial quanto à natureza da amostra. Técnicas de descontaminação para cultivo de micobactérias em materiais com elevada carga contaminante, como solo, água e fezes têm sido pesquisadas (BALIAN et al., 2002; FALKINHAM, 1996; 2004; OLIVEIRA et al., 2007; PARASHAR et al., 2004), e são apresentadas conforme a capacidade de eliminar a microbiota contaminante com menor comprometimento das micobactérias, porém sem levar em consideração o poder quantitativo e repetibilidade.

O processo de descontaminação de solo, por exemplo, envolve três etapas: dissociação de *M. avium* da matéria particulada, concentração e desinfecção. Este processo reduz 95% de *M. avium* presentes na amostra, recuperando apenas 5% do agente e somente 0,25% do total de micobactérias do solo pode ser recuperada como unidades formadoras de colônias (FALKINHAM, 1996). Similarmente, o processo aplicado à descontaminação seletiva de cama sobreposta segue a mesma sequência, resultando nas mesmas limitações quantitativas. Além disso, há diferenças quanto à resistência a distintos métodos de descontaminação entre espécies de micobactérias (PARASHAR et al., 2004).

Falkinham (2004), ao investigar *M. avium* em amostras de água, encontrou correlação positiva entre o número de UFC de *M. avium* isolados e a turbidez (material particulado) das amostras. Isto se deve à hidrofobicidade característica deste gênero bacteriano, o que explica que grande parte das micobactérias presentes na amostra (clínica ou ambiental) possa ser perdida na transferência de recipientes, aderidas às paredes de tubos de ensaio, durante o procedimento de descontaminação (FALKINHAM, 2004). Neste sentido, é plausível concluir que parte das unidades bacterianas inoculadas nas amostras ficaram retidas nas partículas de cama, excluídas da fração propriamente testada, restringindo qualquer interpretação quantitativa.

De fato, pesquisas de micobactérias em cama de suínos têm sido realizadas sem levar em consideração o número de UFCs isolados em cada amostra. Ainda assim, o valor do exame bacteriológico qualitativo de micobactérias em espécimens ambientais permite fazer inferências sobre o papel do ambiente como fonte de infecção (FALKINHAM, 1996; MATLOVA et al., 2005; SONGER et al., 1980). Embora sua interpretação seja menos abrangente do que uma técnica quantitativa, o protocolo pode ser aplicado em pesquisas de micobactérias em cama sobreposta, possibilitando responder questões relativas à epidemiologia das micobacterioses suínas nesse sistema de produção.

Geração/adaptação de tecnologia

O resultado deste trabalho foi a otimização de uma técnica de descontaminação seletiva.

Considerações finais

O método de descontaminação seletiva, adaptado e otimizado neste trabalho apresenta melhor poder de detecção de micobactérias em cama sobreposta de suínos, quando comparado aos métodos convencionais de isolamento a partir de espécimens ambientais, sendo útil para estudos da epidemiologia desses patógenos.

Referências

AMARAL, A. L.; MORÉS, N.; VENTURA, L. V.; COLDEBELLA, A.; LUDKE, J. L.; OLIVEIRA, P. A. V. de; SILVA, V. S. Ocorrência de linfadenite em suínos criados em sistema convencional e cama sobreposta nas fases de crescimento e terminação. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 5, n. 1, p. 64-72, 2006.

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

ELLSWORTH, S. R.; KIRKBRIDE, C.A.; JOHNSON, D. D. Excretion of *Mycobacterium avium* form lesions in the intestine and tonsils of infected swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 9, p. 1526-30, 1980.

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

FALKINHAM J. O. Environmental sources of *Mycobacterium avium* linked to routes of exposure In: PEDLEY, S.; BARTRAM, J.; REES, G.; DUFOUR, A.; COTRUVO, J. (Ed.) **Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management**. London: IWA, 2004.

MATLOVA, L.; DVORSKA, L.; AYELE, W. Y.; BARTOS, M.; AMEMORI, T. Y.; PAVLIK, I. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1261-1268, 2005.

OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUEZ, C. A. R.; ROCHA, V. C. M.; AMBROSIO, S. R.; OHARA, P. M.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; LEÃO, S. C.; FERREIRA NETO, J. S. Comparison of methods for *Mycobacteria* isolation from swine feces **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 687-692, 2007.

PARASHAR, D.; CHAUHAN, D. S.; SHARMA, V. D.; CHAUHAN, A.; CHAUHAN, S. V. S.; KATOCH, V. M. Optimization of procedures for isolation of environmental mycobacteria from soil and water samples of north India. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3751-3753, 2004.

SONGER, J. G.; BICKNELL, E. J.; THOEN, C. O. Epidemiological Investigations of swine tuberculosis in Arizona. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 44, p. 115-20, 1980.