

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO IMUNO-  
HISTOQUÍMICA DAS LESÕES DE TUBERCULOSE EM BOVINOS E  
LINFADENITE GRANULOMATOSA EM SUÍNOS**

Autora: Daniele Andreazza

**Porto Alegre**

**2011/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO IMUNO-  
HISTOQUÍMICA DAS LESÕES DE TUBERCULOSE EM BOVINOS E  
LINFADENITE GRANULOMATOSA EM SUÍNOS**

**Autora:** Daniele Andrezza

**Trabalho de Conclusão de Curso de  
Graduação apresentado à Faculdade de  
Veterinária da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Médico Veterinário.**

**Orientador:** David Driemeier

**Co-orientadora:** Angelica Terezinha  
Barth Wouters

**Porto Alegre**

**2011/2**

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram neste trabalho. Muito obrigada a todo o pessoal do Setor de Patologia Veterinária da UFGRS (SPV-UFRGS), pela compreensão, força e incentivo.

Em especial ao professor David Driemeier pelo incentivo, ensino e pela oportunidade. Muito obrigada Angelica e Flademir, que me acompanharam em alguns finais de semana e algumas várias noites olhando lâminas, dando sugestões, tirando dúvidas. A ajuda de vocês foi essencial. Fabí, muito obrigada por tudo, mesmo sem tempo para nada sempre consegue um tempinho para me ajudar.

Tenho certeza que o conhecimento que adquiri com todos vocês foi essencial e de grande valia na minha vida.

Gi, Suy, Mari, muito obrigada pela ajuda. Sem vocês nem lâminas ou colorações eu teria!

À todos os meus colegas do setor, Bárbara, Matheus, Fabi, Neusa, Dani, Mari, Felipe, Cris, muito obrigada pela compreensão, pela ajuda e pela amizade.

Ao Eduardo não só pela ajuda nos índices e sumários, mas por todo o incentivo que me deu desde as aulas de Patologia Geral, Especial até o estágio.

Quero agradecer a todos os pós-graduandos, pela compreensão, incentivo e auxílio, e pela ótima companhia, que torna nosso dia a dia mais divertido.

Agradeço à minha família por tudo, pelo apoio e incentivo, amor e carinho durante esta etapa da minha vida.

Ao meu namorado, pelo incentivo, força e compreensão.

Às minhas queridas amigas da faculdade, Rachel, Nathalia, Letícia, Ju, Michele, por compartilharmos juntas todos os momentos da faculdade e pela amizade incondicional.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Áreas de necrose caseosa e reação inflamatória granulomatosa com macrófagos epitelioides e abundantes células gigantes. HE: Obj. 10x. ....	21
Figura 2. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Tecido conjuntivo fibroso (em azul) circundante e entremeado à inflamação. TM: Obj. 10x. ....	22
Figura 3. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Bacilos álcool-ácido resistentes (seta) no citoplasma de células gigantes. ZN: Obj. 40x. ....	22
Figura 4. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Marcação positiva para linfócitos T (anti-CD3). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, cromógeno Permanent Red: Obj. 40x. ....	23
Figura 5. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Marcação positiva para linfócitos B (anti-CD79 $\alpha$ cy). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, cromógeno Permanent Red: Obj. 40x. ....	23
Figura 6. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Abundante quantidade de células fagocitárias com marcação positiva para anticorpo anti-CD68. Método estreptavidina ligada à peroxidase, cromógeno DAB: Obj. 10x. Detalhe: célula gigante e macrófago epitelióide com marcação positiva. Obj. 40x. ....	24
Figura 7. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Marcação positiva para o anticorpo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em células gigantes multinucleadas. Método estreptavidina ligada à peroxidase, cromógeno DAB: Obj. 40x. ....	24
Figura 8. Linfadenite granulomatosa em suíno. Necrose caseosa central cercada por inflamação granulomatosa, circundada por TCF. HE: Obj. 10x. ....	25
Figura 9. Linfadenite granulomatosa em suíno. Tecido conjuntivo fibroso (em azul) circundante e entremeado à inflamação granulomatosa. TM: Obj. 10x. ....	26
Figura 10. Linfadenite granulomatosa em suíno. BAAR (corados em rosa) em áreas de necrose caseosa. ZN: Obj. 40x. ....	26
Figura 11. Linfadenite granulomatosa em suíno. Marcação positiva de linfócitos T (anti-CD3). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, cromógeno Permanent Red: Obj. 40x. ....	27
Figura 12. Linfadenite granulomatosa em suíno. Marcação positiva para linfócitos B (anti-CD79 $\alpha$ cy). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, cromógeno Permanent Red: Obj. 40x. ....	27

Figura 13. Linfadenite granulomatosa em suíno. Células inflamatórias marcadas com anticorpo Lisozima. Método estreptavidina ligada à peroxidase, cromógeno DAB: Obj. 10x. .....	28
Figura 14. Linfadenite granulomatosa em suíno. Marcação positiva para o anticorpo Mycobacterium tuberculosis. Método estreptavidina ligada à peroxidase, cromógeno DAB: Obj. 40x. ....	28

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Recuperações antigênicas, diluições, período de incubação e origem dos anticorpos primários utilizados na técnica de imuno-histoquímica. ....	20
Tabela 2. Média dos cinco campos microscópicos avaliados em lesões de tuberculose para caracterização do infiltrado linfocitário (linfócitos T, marcados com anticorpo Anti-CD3; e linfócitos B, com marcação positiva para o anticorpo Anti-CD79 $\alpha$ cy) em bovinos.....	31
Tabela 3. Média dos cinco campos microscópicos avaliados em linfonodos com lesões granulomatosas por <i>Mycobacterium</i> sp. para caracterização do infiltrado linfocitário (linfócitos T, marcados com anticorpo Anti-CD3; e linfócitos B, com marcação positiva para o anticorpo Anti-CD79 $\alpha$ cy) em suínos.....	32

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>

## RESUMO

*Mycobacterium* sp. é causa de inflamação granulomatosa em diferentes espécies animais. *Mycobacterium bovis* e o Complexo *Mycobacterium avium* são importantes patógenos de bovinos e suínos e podem causar infecções em humanos, principalmente imunodeprimidos. Perdas na produção, barreiras comerciais e perdas por condenação de carcaças em abatedouros estão relacionadas à ocorrência destas infecções, que implicam em grandes prejuízos econômicos. Foi realizado um estudo dos casos diagnosticados como tuberculose em bovinos e linfadenite granulomatosa em suínos no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS) no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011. Dados referentes a raça, sexo, idade, histórico clínico foram compilados dos livros de registro e analisados. As características histológicas de lesões em linfonodos e pulmões foram revisadas em HE e as técnicas histoquímicas de Ziehl Neelsen e Tricrômio de Masson foram utilizadas para evidenciar, respectivamente, a presença de bacilos álcool-ácido resistentes e tecido conjuntivo fibroso nas lesões. A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi utilizada em 25% dos casos de cada espécie, selecionados aleatoriamente, para a caracterização do infiltrado inflamatório linfocitário. Foram utilizados os anticorpos anti-CD3 para a marcação de linfócitos T e anti-CD79 $\alpha$ cy para a marcação de linfócitos B. Linfócitos T predominaram nas lesões em ambas as espécies; 61,35% e 62% dos linfócitos apresentaram marcação positiva em bovinos e suínos, respectivamente. Adicionalmente foram marcados macrófagos com o uso do anticorpo anti-CD68 para bovinos e Lisozima para suínos. O anticorpo *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizado para a detecção de bactérias do gênero *Mycobacterium* spp. Histologicamente, células gigantes predominaram nas lesões de tuberculose bovina e, em suínos, macrófagos epitelioides foram mais abundantes.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium*, imuno-histoquímica, bovinos, suínos



## ABSTRACT

*Mycobacterium* sp. are the cause of granulomatous inflammation in different animal species. *Mycobacterium bovis* and the *Mycobacterium avium* complex are important bovine and swine pathogens that can cause infection in human beings, especially in those immunosuppressed. Production losses, commercial barriers and carcasses condemnations in slaughtering are related to this infection occurrence, which implies in large economic losses. It was carried out a study on bovine tuberculosis and granulomatous lymphadenitis in pigs, diagnosed by the Setor de Patologia Veterinária from UFRGS (SPV-UFRGS) between January 2007 and December 2011. Data concerning race, sex, age and clinical history were compiled from the registry books and were analyzed. Histological characteristics of the lesions in lymph nodes and lungs were revised in H.E staining. Ziehl Neelsen and Masson's trichrome techniques were used respectively to evidence the resistant acid-basic bacillus and fibrous connective tissue in lesions. The immunohistochemistry (IHQ) technique was performed in 25% of the cases from each species, randomly chosen to characterize the lymphocytic inflammatory infiltrate. Anti-bodies anti-CD3 were utilized to lymphocytes T immunolabeling and anti-CD79 $\alpha$ cy to lymphocytes B immunolabeling. Lymphocytes T were predominant in both species lesions; 61.35% and 62% of the lymphocytes presented positive immunostaining in bovine and swine respectively. In addition, macrophages were immunolabeled by antibody anti-CD68 to bovine and lysozyme to swine. *Mycobacterium tuberculosis* antibody was used to detect bacteria of the genus *Mycobacterium*. Histologically, giant cells were predominant in bovine tuberculosis lesions and epithelioid macrophages were abundant in swine.

**Keyword:** *Mycobacterium*, immunohistochemistry, bovine, swine.

## 1. INTRODUÇÃO

Tuberculose é uma doença crônica, contagiosa, induzida por bactérias álcool-ácido-resistentes (BAAR) do gênero *Mycobacterium* (COETZER & TUSTIN, 2004). Ocorre mundialmente e provoca grandes impactos na produção, principalmente em bovinos de leite (RADOSTITS et al., 2007; BEYTUT, 2011). Há perda de 10 a 25% da eficiência produtiva, perdas por mortes e instalação de barreiras comerciais (COETZER & TUSTIN, 2004; LIEBANA et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007; THAKUR, 2010). Em suínos, a doença apresenta caráter benigno e podem não ocorrer perdas financeiras relacionadas à doença clínica, porém órgãos com lesões tuberculosas são descartados e carcaças inteiras podem ser condenadas ou requererem tratamento térmico antes de liberadas para o consumo humano (RADOSTITS et al., 2007).

A tuberculose é uma importante zoonose, principalmente em humanos imunologicamente comprometidos, especialmente em países em desenvolvimento (RADOSTITS et al., 2007; THAKUR, 2011). *Mycobacterium bovis* é responsável por aproximadamente 5 a 10% dos casos de tuberculose humana (RADOSTITS et al., 2007; SCHILLER et al., 2011). Recente estudo verificou a presença de *M. bovis* e *M. tuberculosis* em bovinos reativos à tuberculina intra-dérmica (THAKUR, 2011). Isto ressalta a importância da doença e seus riscos à saúde pública.

O gênero *Mycobacterium* consiste em cerca de 50 espécies, muitos são saprófitas ambientais que existem e se multiplicam numa ampla variedade de substratos como o solo, a água e em plantas, mamíferos domésticos e silvestres e aves (COETZER & TUSTIN, 2004; CASWELL & WILLIAMS, 2007). Algumas destas micobactérias saprófitas podem causar infecções oportunistas (COETZER & TUSTIN, 2004).

As micobactérias são cocobacilos pleomórficos, aeróbicas, consideradas Gram-positivas (embora não estáveis pela coloração de Gram), imóveis, não formadoras de esporos. Contém lipídeos na parede celular (ácidos micólicos hidrofóbicos), que conferem resistência ambiental a ácidos, dessecação e a muitos desinfetantes, além de resistência a antimicrobianos. Estes lipídeos influenciam também em características de crescimento e hidrofóbicas em meios fluidos (COETZER & TUSTIN, 2004; CASWELL & WILLIAMS, 2007).

As três espécies do bacilo; *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium*, ocorrem mais frequentemente em seus respectivos hospedeiros, mas infecções cruzadas podem ocorrer, com infecção de várias outras espécies animais (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

As micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, conhecidas como bacilo tuberculoso, podem causar tuberculose em humanos e animais e compreendem as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti* (COETZER & TUSTIN, 2004).

As mais importantes micobactérias causadoras de doença em bovinos são *Mycobacterium bovis*, alguns sorovares do Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* e *Mycobacterium avium paratuberculosis* (COETZER & TUSTIN, 2004). Em regiões da Áustria e da Itália é descrita tuberculose em bovinos por *M. caprae* (SCHILLER et al., 2011).

*Mycobacterium bovis* é agente de tuberculose preferencialmente em bovinos, mas pode afetar outras espécies de animais vertebrados, domésticos e silvestres, incluindo humanos, se em contato com bovinos tuberculosos e/ou suas secreções (COETZER & TUSTIN, 2004). A ingestão de leite de vacas com tuberculose e não pasteurizado é a principal rota de infecção em humanos, produzindo linfadenite cervical ou outras formas não pulmonares da doença, que pode ocorrer também por inalação ou contaminação cutânea (COETZER & TUSTIN, 2004; CASWELL & WILLIAMS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; THAKUR, 2010). Todas as espécies são suscetíveis à infecção por *M. bovis*, e em diferentes idades, no entanto, a suscetibilidade à doença é maior em bovinos, caprinos e suínos, quando comparada a ovinos e equinos, que exibem elevada resistência natural à infecção (RADOSTITS et al., 2007). Os bovinos infectados são a principal fonte de contaminação para outros bovinos. Os microrganismos são excretados no ar expirado, no escarro, nas fezes, no leite, na urina, em descargas vaginais e uterinas e descargas de linfonodos periféricos fistulados. Experimentalmente, a excreção do microrganismo inicia cerca de 90 dias após a infecção. Grande número de espécies selvagens são naturalmente infectadas por *M. bovis*, consideradas, assim, importantes fontes de infecção para os bovinos. Em países desenvolvidos a ocorrência da tuberculose está associada a reservatórios silvestres (RADOSTITS et al., 2007).

A inalação é a principal via de entrada do agente em bovinos estabulados e, nos mantidos em pastagens pode ser considerado o principal modo de transmissão (RADOSTITS et al., 2007; NUGENT, 2011). A transmissão por ingestão pode ocorrer quando de pastagens contaminadas por fezes e uso de bebedouros e cochos coletivos. O microrganismo pode sobreviver por longos períodos nas fezes e no solo e ter sua infectividade mantida. Em

pastagens pode sobreviver por semanas até alguns meses, porém, como requer elevada dose infectante, a ingestão não é a forma de maior importância na epidemiologia da doença (CASWELL & WILLIAMS, 2007; RADOSTITS et al., 2007). A ingestão de leite contaminado por animais jovens é um modo comum de transmissão em lugares com doença endêmica (NUGENT, 2001; RADOSTITS et al., 2007), no entanto, a infecção mamária ocorre tardiamente no curso da doença. Infecção intrauterina pode ocorrer durante o coito, no uso de sêmen infectado ou na utilização de pipetas uterinas contaminadas; transmissão transplacentária resulta de tuberculose endometrial e infecção intramamária pode ocorrer pelo uso de dispositivos intramamários contaminados ou copos coletores de ordenhadeira infectados. Inoculação cutânea é também relatada (CASWELL & WILLIAMS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; NUGENT, 2011). Fatores ambientais, como o estabulamento, a criação intensiva e de grande número de animais predis põem à doença (RADOSTITS et al., 2007).

Na espécie bovina, a tuberculose é tipicamente manifestada pela formação, em vários tecidos, mas particularmente em pulmões e linfonodos, de granulomas conhecidos como tubérculos, os quais consistem de tecido conjuntivo com centro necrótico caseoso circundado por zona de inflamação granulomatosa (COETZER & TUSTIN, 2004; BEYTUT, 2011).

As lesões da tuberculose se disseminam pelo corpo em dois estágios, o complexo primário e a disseminação pós-primária. O complexo primário consiste da lesão da porta de entrada e em linfonodo local. Quando a infecção ocorre por inalação a lesão na porta de entrada é comum e leva à infecção das vias aéreas superiores e inferiores, onde são infectados macrófagos alveolares, e de linfonodos associados (CASWELL & WILLIAMS, 2007; BEYTUT, 2011; VELÁZQUEZ et al., 2011). Quando ocorre via trato alimentar a lesão no sítio de entrada não é comum, embora úlceras nas tonsilas e no trato intestinal possam ocorrer. As lesões são mais comumente observáveis no intestino e em linfonodos associados, principalmente linfonodos faríngeos ou mesentéricos. A distribuição das lesões e os sinais clínicos dependem do modo de transmissão (CASWELL & WILLIAMS, 2007; RADOSTITS et al., 2007). Um foco primário visível se desenvolve cerca de oito dias após a infecção e o início dos efeitos bacterianos. A calcificação inicia cerca de duas semanas mais tarde. O foco necrótico circundado por tecido granulomatoso, monócitos e plasmócitos caracteriza o tubérculo patognomônico. As bactérias passam deste foco primário, localizado em cerca de 90-95% dos casos no trato respiratório, para linfonodos regionais em que induzem lesões semelhantes. Após o complexo primário ocorre a disseminação pós-primária e a doença pode assumir a forma de tuberculose miliar aguda, que consiste em lesões nodulares discretas em

vários órgãos, ou tuberculose crônica em órgãos relacionada à reinfeção endógena ou exógena de tecidos sensibilizados à tuberculoproteína. Os sinais clínicos variam conforme com o local da infecção, no entanto, como a doença é progressiva, há constante toxemia com resultantes fraqueza, debilidade e, eventualmente, morte do animal (RADOSTITS et al., 2007).

A infecção depende de fatores bacterianos, como dose e patogenicidade, bem como de fatores do hospedeiro, que incluem a competência do estado imune e a resistência genética à tuberculose (CASWELL & WILLIAMS, 2007). Bovinos de origem zebuína são naturalmente mais resistentes à tuberculose do que bovinos europeus e as lesões tendem a ser menos severas (RADOSTITS et al., 2007).

No trato respiratório, as lesões são mais comuns em linfonodos retrofaríngeos, bronquiais e mediastínicos e menos frequentes em linfonodos submandibulares e parotídeos e nas tonsilas palatínicas. Nos pulmões as lesões são detectadas em apenas 10-20% dos bovinos e 90% destas lesões afetam os lobos caudais (PALMER, 2007; CASWELL & WILLIAMS, 2007; BEYTUT, 2011). A maior parte do parênquima pulmonar está localizada nos lobos caudais. Além disso, há diferença na tensão de oxigênio em diferentes regiões pulmonares. Há alta relação de ventilação/perfusão nas regiões cranioventrais quando comparadas à região dorsocaudal, que gera hipóxia relativa na região dorsocaudal e pode resultar em função ineficiente dos macrófagos (CASWELL & WILLIAMS, 2007; PALMER et al., 2007). As lesões são circunscritas, muitas vezes encapsuladas, com 0,11-4,0cm de diâmetro, inflamação granulomatosa focal amarela-pálida ou brancacenta, muitas vezes com necrose caseosa e/ou mineralização. Grandes lesões podem conter exsudato supurativo ou liquefeito. O bacilo pode ser liberado dos granulomas para as vias respiratórias e, ao tossir, o escarro infectado pode ser ingerido com extensão da infecção a intestino e linfonodos mesentéricos e iniciar ulcerações ou tubérculos ulcerados ou, por aspiração, provocar sítios pulmonares secundários. A erosão da pleura pela expansão dos granulomas pulmonares e disseminação via linfática pode resultar em implantação do bacilo na cavidade pleural, com desenvolvimento de múltiplos granulomas na sua superfície (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

Lesões generalizadas são descritas em 1% dos animais com lesões de tuberculose e, provavelmente, resultam de disseminação hematógena do bacilo por erosões em paredes vasculares, por expansão do tubérculo. Lesões embólicas são mais comuns em pulmões, e podem envolver linfonodos, ossos, fígado, rins, glândula mamária, útero, pleura, peritônio, pericárdio e meninges. Em algumas instâncias, inúmeros pequenos focos brancacentos são formados a partir da liberação do bacilo na circulação, caracterizando o termo tuberculose

miliar. Em carcaças com lesões generalizadas, lesões variáveis em tamanho e intensidade de necrose caseosa ou fibrose podem estar presentes e implicam em menor, porém mais prolongada bacteremia (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

Histologicamente a lesão inclui: massa central com necrose caseosa composta por material eosinofílico homogêneo com núcleos escassos e variável grau de mineralização, camada de macrófagos e células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, cápsula contendo linfócitos, aglomerados de neutrófilos em alguns casos e uma borda de tecido conjuntivo em lesões crônicas (CASWELL & WILLIAMS, 2007; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007) e raras a numerosas bactérias álcool-ácido-resistentes em macrófagos e células gigantes da zona do manto, ou extracelularmente, no centro caseoso (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

Em suínos, a ocorrência da doença reflete a situação na população local de bovinos. Sua infecção ocorre por ingestão de produtos lácteos ou por pastoreio na mesma pastagem. A baixa prevalência da doença em suínos é devida a vários fatores, particularmente à tendência da doença permanecer localizada (não disseminada) nessa espécie e também devido à idade de abate. A prevalência é maior em suínos velhos. Surto podem ocorrer quando da ingestão de carcaças bovinas contaminadas (RADOSTITS et al., 2007).

As micobacterioses, diferentemente da tuberculose, são associadas a micobactérias não tuberculosas, ou atípicas, pertencentes ao Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), que inclui *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. paratuberculosis*, *M. lepraemurium*, *M. fortuitum*, *M. silvaticum*, *M. scrofulaceum* (COETZER & TUSTIN, 2004; RADOSTITS et al., 2007; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; HIBIYA et al., 2010). O MAC é composto de patógenos oportunistas ubíquos (HIBIYA et al., 2010) de grande número de espécies animais e humanos (INGEN et al., 2010), mas com maior importância em suínos. Ocorre em todos os continentes e os microrganismos podem ser isolados do solo, de plantas, água e alimentos dos animais (KOMIJI et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007). São extremamente resistentes, podendo sobreviver vários meses nas instalações dos animais e por anos no solo (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). A micobacteriose associada a este microrganismo normalmente não se manifesta clinicamente e não causa problema como doença, no entanto, interfere em testes diagnósticos para *Mycobacterium bovis*, pois infecta animais reativos à tuberculina mamífera (RADOSTITS et al., 2007).

*Mycobacterium avium* subsp. *avium*, comumente distribuído no ambiente, é patógeno primário de aves e causa tuberculose nesta espécie. Devido à característica zoonótica da

infecção, tem sido considerado problema veterinário e econômico (STEPANOVA et al., 2011).

Infecções com bactérias atípicas ocorrem em humanos e apresentam alta prevalência em imunodeprimidos. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* pode causar infecções oportunistas, especialmente em pacientes infectados por HIV. Membros do MAC provocam infecção pulmonar em humanos imunocompetentes e lesões disseminadas em hospedeiros imunodeprimidos. (RADOSTITS et al., 2007; KOMIJN et al., 2007). Linfadenite devida a micobactérias não tuberculosas (NTM) afeta principalmente crianças e é induzida por uma variedade de NTM, predominantemente *M. avium* (INGEN et al., 2010).

Os suínos são suscetíveis à infecção por MAC, Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis* (THOEN, 2006). No entanto, mundialmente a micobacteriose em suínos é devida ao MAC e, no Brasil, constitui o maior grupo de bactérias envolvidas em infecções de linfonodos suínos (LARA et al., 2011). De frigoríficos de suínos abatidos com inspeção federal na Região Sul do Brasil, de 111 amostras de micobactérias isoladas, 107 pertenciam ao MAC e apenas 4 eram *M. bovis* (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). Em outro estudo para verificação dos agentes encontrados em linfonodos suínos, *Mycobacterium avium* subespécies 1 e 2 foram os mais frequentes, sendo isolados em 64% dos casos (LARA et al., 2011). Em um estudo de avaliação de micobactérias não tuberculosas em linfonodos de suínos abatidos INGEN et al. (2010) encontraram incidência 39,87% de *M. avium*, que constituiu o agente da maioria das infecções. HIBIYA et al. (2010) isolaram *M. avium* em 93 de 94 amostras de suínos sistemicamente infectados.

Em suínos, amostras do MAC provocam linfadenite granulomatosa, principalmente em linfonodos mesentéricos e da cabeça (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; INGEN et al., 2010). Diferentemente da tuberculose bovina, a micobacteriose não afeta o desempenho produtivo dos suínos, porém é causa significativa de perdas para produtores e indústrias devido à depreciação de carcaças (MORÉS, et al. 2007; RADOSTITS et al., 2007; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). Órgãos com lesões e até carcaças inteiras podem ser condenadas, ou requerer tratamento térmico para liberação ao consumo humano (MATLOVA et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). Estudo realizado com suínos abatidos entre 2002 e 2004 na Província de Okinawa, Japão, mostra não haver diferença significativa na média de peso das carcaças de suínos abatidos com infecção sistêmica por MAC e suínos não infectados (HIBIYA et al., 2008).

A ingestão parece ser a rota normal de infecção e suínos contaminados excretam o organismo nas fezes (THOEN, 2006; RADOSTITS et al., 2007). O trato gastrointestinal é a

rota preferencial para infecção por MAC em suínos (HIBIYA et al., 2008). Após a ingestão, o microrganismo penetra na mucosa do sistema digestório e atinge linfonodos que drenam a região, principalmente os cefálicos e os mesentéricos. Nos linfonodos, os bacilos são fagocitados por macrófagos e produzem granulomas compostos de células histiocitárias e líquido, que evolui para necrose de liquefação e muitas vezes, mineralização. (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

As principais fontes de infecção são serragem ou maravalha contaminada, excretas de suínos ou aves infectados e água ou ração contaminados (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; LARA et al., 2011). A transmissão ocorre facilmente de suíno para suíno na mesma baía. HIBIYA et al. (2010) associaram a disseminação do microrganismo ao transporte de animais infectados.

As lesões em suínos geralmente são restritas a linfonodos da cadeia alimentar, da região cervical e mesentéricos, mas pode ocorrer infecção sistêmica com lesões em órgãos como fígado, pulmão e baço. (IWAKIRI et al., 2001; MATLOVA et al., 2005; THOEN, 2006; HIBIYA et al., 2008; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; HIBIYA et al., 2010). MORÉS et al. (2007) encontraram lesões em linfonodos da cadeia alimentar em 95,2% de carcaças analisadas em frigoríficos e LARA et al., (2011) isolaram micobactérias em 31 linfonodos com lesões granulomatosas. Destas, 61,3% estava em linfonodos submaxilares e 38,7% em mesentéricos.

As lesões em suínos se apresentam como granulomas localizados em linfonodos aumentados de volume com alterações facilmente observáveis ao corte como pequenos nódulos a lesões de dimensões variáveis, branco-amareladas, caseosas, às vezes mineralizadas (MATLOVA et al., 2005; THOEN, 2006; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

A diferenciação entre tuberculose e micobacteriose é difícil em suínos, no entanto, algumas características podem auxiliar nessa diferenciação. *M. bovis* e *M. tuberculosis* produzem tubérculos caseosos e mineralizados, similares aos dos bovinos e as lesões são, muitas vezes, circundadas por cápsula fibrosa. *M. avium* produz lesões proliferativas que consistem de tubérculos com tecido de granulação e podem ser uniformes, acinzentados, lisos. A mineralização é escassa, poucos focos caseosos podem ser observados à superfície da lesão, mas podem estar presentes áreas relativamente grandes de necrose caseosa, ocasionalmente envolvendo todo o linfonodo e abundante fibrose, difusa, com pouca tendência à encapsulação. O aspecto histológico é de numerosos bacilos, infiltração difusa de macrófagos, células epitelioides e células gigantes multinucleadas de Langhans acompanhadas por



extensiva fibroplasia (THOEN, 2006; CASWELL & WILLIAMS, 2007; RADOSTITS et al., 2007).

A imunidade em infecções por micobactérias é essencialmente mediada por células e as características estruturais de *Mycobacterium* são responsáveis pela indução deste tipo de resposta imune. (CASWELL & WILLIAMS, 2007; LIEBANA et al., 2007; VELÁZQUEZ et al., 2011). A cera e os glicolípídios da parede celular bacteriana são importantes indutores da resposta inicial dos macrófagos e, junto com os peptideoglicanos são responsáveis pela maior atividade adjuvante da bactéria, que facilita o recrutamento das células apresentadoras de antígenos. Outros glicolípídios (micosídeos) formam uma barreira contra a digestão lisossomal e expandem a habilidade do microrganismo em sobreviver após a fagocitose pelos macrófagos. A sobrevivência intracelular é também facilitada pela inibição da fusão dos fagossomos com lisossomos. As tuberculoproteínas, substâncias imunorreativas das micobactérias, e os adjuvantes lipídicos estão presentes na infecção e resultam no desenvolvimento da resposta imune humoral e mediada por célula. Anticorpos humorais podem ser demonstrados por técnicas sorológicas, mas não participam no desenvolvimento das lesões ou na produção da imunidade. A resposta mediada por célula é responsável por esses aspectos da doença. Importante na patogênese da infecção por micobactérias é sua habilidade em sobreviver em macrófagos, e o papel da resposta imune celular em iniciar inflamação granulomatosa e aumentar a habilidade dos macrófagos para destruir o bacilo (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

Na primeira fase da infecção os bacilos são fagocitados por macrófagos e podem ser eliminados. Alternativamente, os macrófagos infectados podem permanecer no sítio de infecção primário por prolongados períodos antes da doença progredir. A resposta imune inata inicial desenvolvida no sítio primário da infecção faz com que os macrófagos secretem citocinas (particularmente fator de necrose tumoral- $\alpha$  e quimiocinas, e óxido nítrico) (CASWELL & WILLIAMS, 2007; PALMER et al., 2007, VELÁZQUEZ et al., 2011) que recrutam macrófagos e linfócitos para o sítio. Os macrófagos estimulados pela exposição à micobactéria secretam interleucina-12, que induz a resposta imune à secreção de interferon- $\gamma$  e interleucina-2 pelos linfócitos T helper CD4+. O interferon produzido pelos linfócitos T helper sinalizam o desenvolvimento de resposta imune mediada por célula, detectada 14-28 dias após por testes positivos de tuberculina na pele. A chegada desses linfócitos antígeno-específicos é crucial para a defesa do hospedeiro, bem como a ativação de macrófagos, permitindo-lhes superar o bloqueio na maturação do fagossomo, e a regulação de substâncias bactericidas, incluindo nitrogênio reativo, oxigênio intermediário e enzimas lisossomais, com

destruição intracelular do bacilo. Os macrófagos ativados aparecem como células epitelioides e há formação de células gigantes multinucleadas, com abundante citoplasma e bordas celulares indistintas. As citocinas, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$  atuam sinergicamente para promover a formação do granuloma tuberculoide, uma estrutura dinâmica que previne a disseminação da infecção para outros sítios pulmonares, bem como a transmissão de animal para animal, e representa um alvo localizado para a resposta imune (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

O bacilo contido no centro caseoso não se multiplica, mas permanece dormente como uma infecção latente que pode persistir por anos até que uma imunossupressão causada por doenças, drogas, hormônios, subnutrição ou outros fatores que alterem o equilíbrio entre agente e hospedeiro permitam a proliferação do patógeno e reativação da doença (CASWELL & WILLIAMS, 2007). A resposta à infecção por micobactérias varia muito nas diferentes espécies animais, e tem menor variação entre indivíduos de uma mesma espécie (COETZER & TUSTIN, 2004).

O objetivo deste trabalho é diferenciar histologicamente as lesões causadas por micobactérias em bovinos e suínos e caracterizar seu infiltrado inflamatório com auxílio de técnicas histoquímicas e da imuno-histoquímica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo dos casos diagnosticados como tuberculose em bovinos e linfadenite granulomatosa em suínos da rotina de exames anatomopatológicos e de necropsias do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), do período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011. Dados referentes a raça, sexo, idade, históricos clínicos e achados macroscópicos foram compilados dos livros de registro e analisados. As características histológicas foram revisadas em cortes de linfonodo e pulmão corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Foram realizadas as técnicas histoquímicas de Ziehl-Neelsen para a identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) nas lesões em linfonodo e pulmão, e de Tricrômio de Masson (TM) para evidênciação de tecido conjuntivo fibroso. Dos bovinos, apenas casos que apresentaram lesões em pulmão e linfonodos foram selecionados.

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi utilizada em 25% dos casos levantados de cada espécie, selecionados aleatoriamente, para a caracterização do infiltrado inflamatório linfocitário, utilizando-se os anticorpos anti-CD3 para a marcação de linfócitos T e anti-CD79 $\alpha$ cy para a marcação de linfócitos B. Para a marcação de macrófagos foi utilizado o anticorpo anti-CD68 nos casos de bovinos e anti-lisozima para os suínos. Para a marcação de bactérias do gênero *Mycobacterium* foi utilizado o anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis*. Utilizaram-se o método estreptavidina ligada à peroxidase e o cromógeno DAB (Dako, code K3468) para os anticorpos anti-CD68, anti-lisozima e anti-*Mycobacterium tuberculosis* e o método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina e o cromógeno Permanent Red (Dako, code K0695) para os anticorpos anti-CD3 e anti-CD79 $\alpha$ cy.

A recuperação antigênica, a diluição, o período de incubação, e a origem dos anticorpos primários estão descritos na Tabela 1.

O infiltrado linfocitário foi classificado de acordo com marcação positiva para linfócitos T ou B. Foram avaliados cinco campos microscópicos em cada técnica/caso, em objetiva de 40x e classificados em uma das quatro categorias; I (0-25%); II (25-50%); III (50-75%) e IV (75-100% da população linfocitária com marcação positiva).

Tabela 1. Recuperações antigênicas, diluições, período de incubação e origem dos anticorpos primários utilizados na técnica de imuno-histoquímica.

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Diluição</b>	<b>Incubação</b>	<b>Origem (referência comercial)</b>
Monoclonal mouse anti-Human CD79 $\alpha$ Clone HM57.	Tampão citrato, pH 6,0 – 20’ forno micro-ondas	1:30	90’ - 37°C	Dako Cytomation (Code M7051)
Polyclonal rabbit anti-Human CD3	Protease XIV (Sigma) – 15’ Temperatura ambiente	1:500	90’ - 37°C	Dako Cytomation (Code A0452)
Monoclonal mouse anti-Human CD68 Clone EBM11	Proteinase K (Dako, S3004) – 10’ Temperatura ambiente	1:100	90’ - 37°C	Dako (Code M0718)
Polyclonal rabbit anti-Human Lysozyme EC 3.2.1.17	Proteinase K (Dako, S3004) – 10’ Temperatura ambiente	1:200	90’ - 37°C	DakoCytomation (Code A0099)
Policlonal rabbit <i>Mycobacterium tuberculosis</i> antibody	Protease XIV (Sigma) – 15’ Temperatura ambiente	1:200	90’ - 37°C	GeneTex, Inc. (GTX20905)

### 3. RESULTADOS

De janeiro de 2007 a dezembro de 2011 foram diagnosticados 60 casos de tuberculose em bovinos e 57 casos de linfadenite granulomatosa em suínos.

Dos bovinos, foram recebidas 57 amostras para exame anatomopatológico e realizadas 3 necropsias. Desses, 45 eram fêmeas e 12 machos. O sexo não foi informado em 3 casos. A raça, informada em 41 casos, variou entre zebuína (2), Holandês (35), Jersey (1) e mista (3). Com relação à origem das amostras, 32 casos provinham de propriedades particulares e 27 casos de abatedouros/frigoríficos. Em um caso a origem não foi identificada. A idade dos bovinos variou de 3 a 20 anos. Dos órgãos acometidos, 40 animais apresentaram lesão apenas em linfonodos, 8 apenas em pulmão e 12 em ambos.

As lesões histológicas se caracterizaram por lesões multifocais a coalescentes até extensas áreas de necrose caseosa central, com graus variados de calcificação multifocal, ausente em alguns casos. Adjacente à necrose havia inflamação granulomatosa com células epitelioides abundantes, células gigantes do tipo Langhans, linfócitos escassos a abundantes (**Figura 1**). O tecido conjuntivo fibroso periférico, evidenciado pela coloração de Tricrômio de Masson, era escasso a abundante, circundando a lesão ou, em alguns casos, entremeado à inflamação (**Figura 2**).

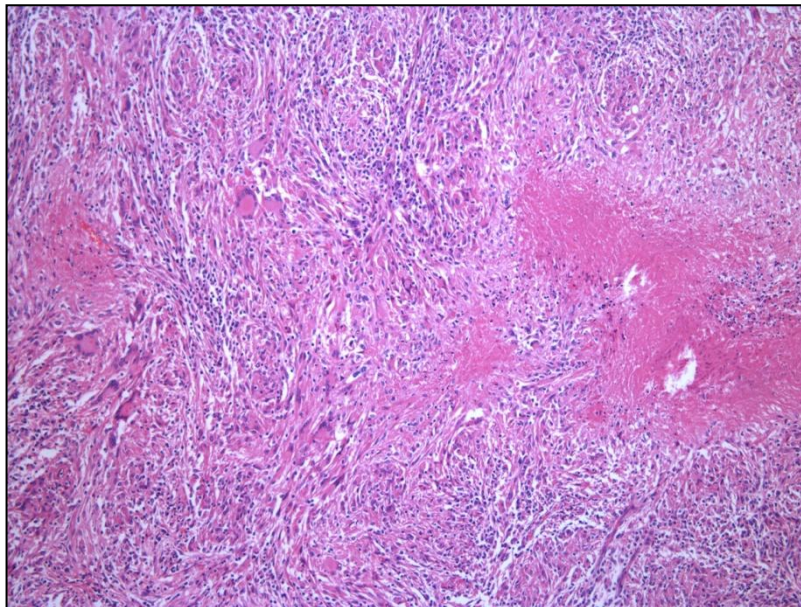


Figura 1. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Áreas de necrose caseosa e reação inflamatória granulomatosa com macrófagos epitelioides e abundantes células gigantes. HE: Obj. 10x.

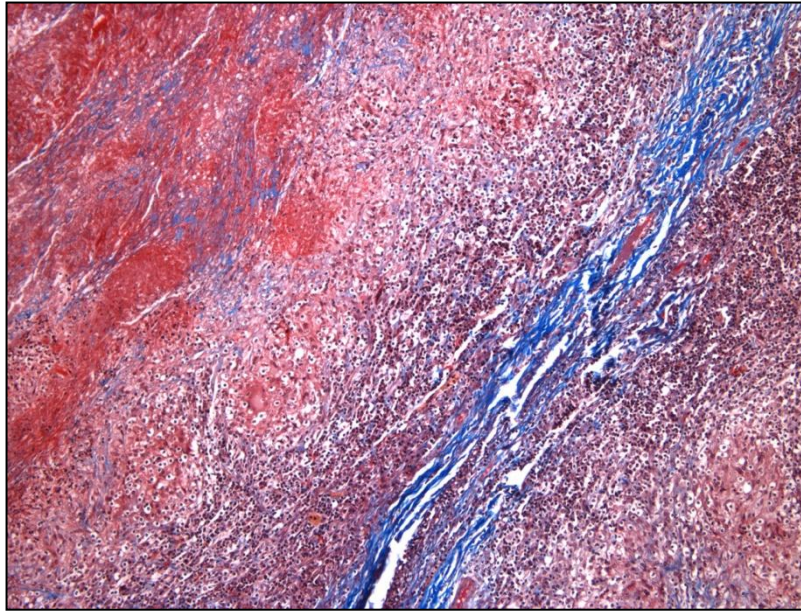


Figura 2. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Tecido conjuntivo fibroso (em azul) circundante e entremeadado à inflamação. TM: Obj. 10x.

Bacilos álcool-ácido resistentes, evidenciados pela coloração de Ziehl Neelsen (ZN), estavam presentes em pequena quantidade, localizados no interior de células gigantes e livres na área de necrose (**Figura 3**).

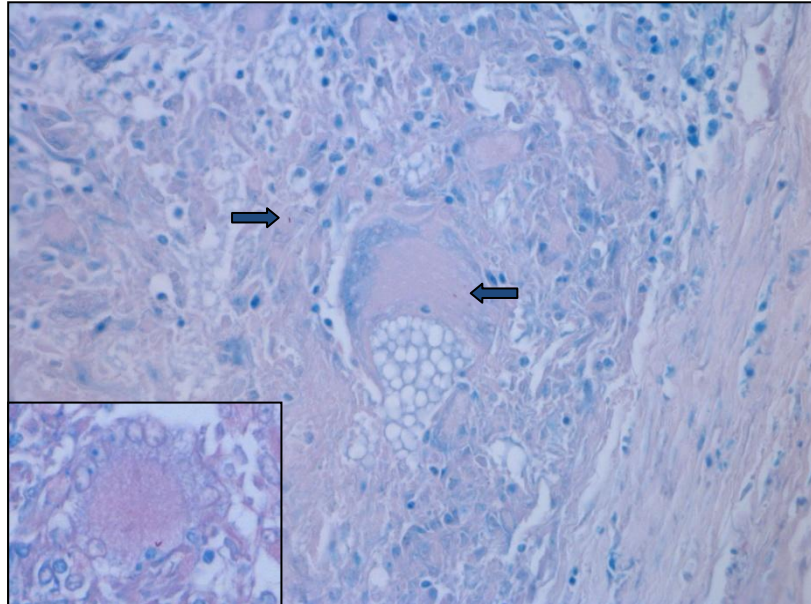


Figura 3. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Bacilos álcool-ácido resistentes (seta) no citoplasma de células gigantes. ZN: Obj. 40x

A técnica de Imuno-histoquímica foi realizada em 15 dos casos de tuberculose bovina (25%) para a caracterização do infiltrado linfocitário. Em 47,3% dos casos foi predominante a marcação para linfócitos T (anticorpo anti-CD3), com uma proporção de células positivas de 3:1, em relação aos linfócitos B (anticorpo anti-CD79 $\alpha$ cy). Nos outros 47,3% dos casos, a

marcação para linfócitos T e B manteve a proporção de 2:2 para células com marcação positiva. Em um caso a marcação para linfócitos B foi maior do que para linfócitos T. Considerando a média de todos os campos avaliados, linfócitos T tiveram marcação positiva em 61,5% das células, enquanto que linfócitos B tiveram marcação de 38,5% nas lesões avaliadas. (**Figura 4 e 5**).

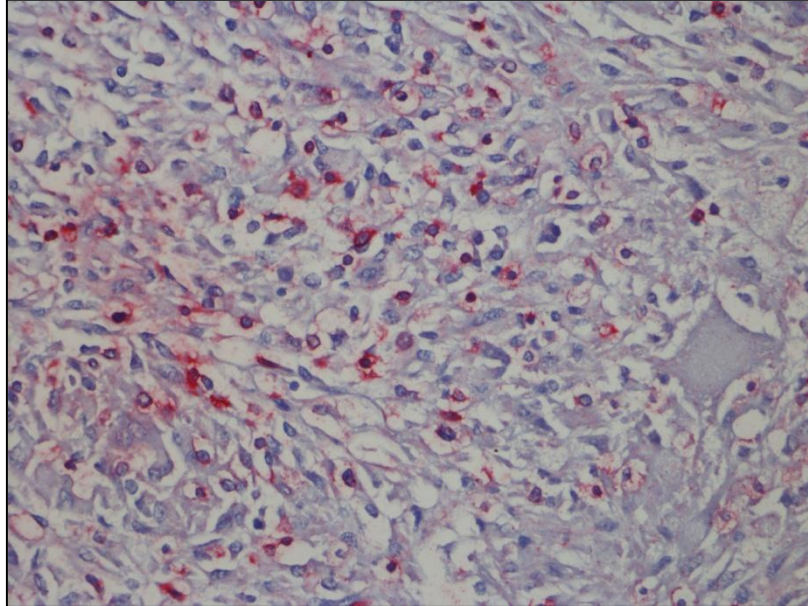


Figura 4. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Marcação positiva para linfócitos T (anti-CD3). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, cromógeno Permanent Red: Obj. 40x.

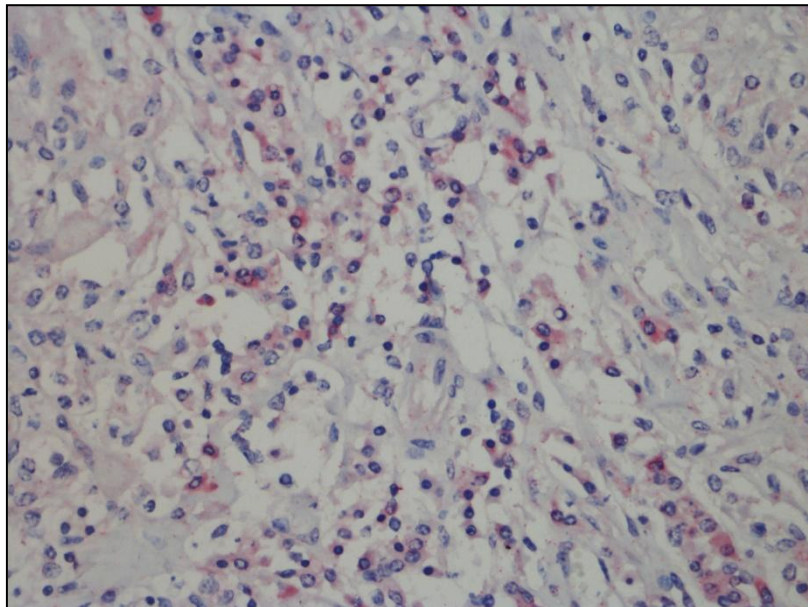


Figura 5. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Marcação positiva para linfócitos B (anti-CD79 $\alpha$ ). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, cromógeno Permanent Red: Obj. 40x.

A marcação para o anticorpo anti-CD68 foi positiva em todos os casos. Abundante quantidade de células gigantes foi observada (**Figura 6**).

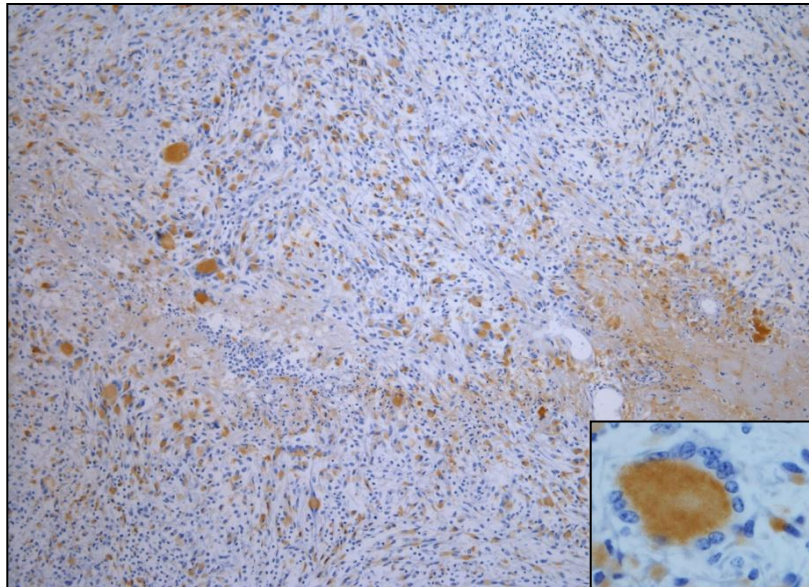


Figura 6. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Abundante quantidade de células fagocitárias com marcação positiva para anticorpo anti-CD68. Método estreptavidina ligada à peroxidase, cromógeno DAB: Obj. 10x. Detalhe: célula gigante e macrófago epitelióide com marcação positiva. Obj. 40x.

A técnica de IHQ usando o anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis* evidenciou, em células epitelióides e células gigantes de Langhans, pontos citoplasmáticos fortemente marcados indicando a presença de *Mycobacterium* sp. (**Figura 7**). Em 2 casos, a marcação foi muito intensa em áreas de necrose e em células gigantes e macrófagos.

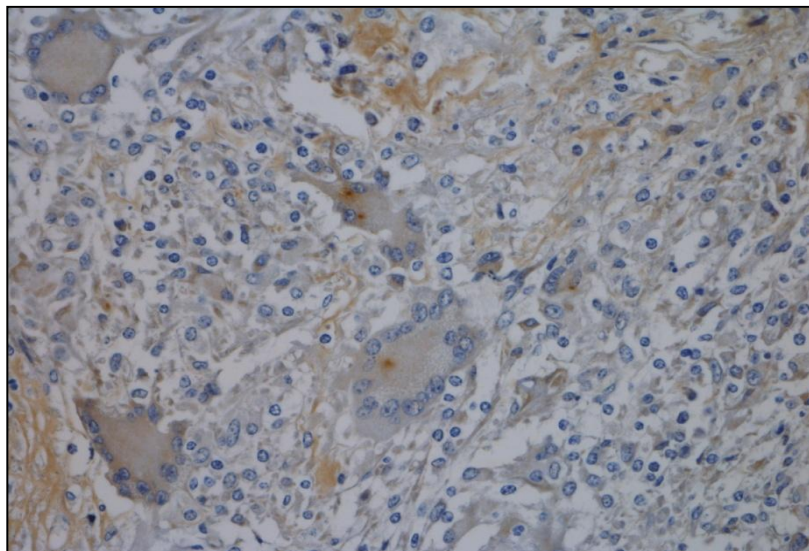


Figura 7. Lesão de tuberculose em linfonodo bovino. Marcação positiva para o anticorpo *Mycobacterium tuberculosis* em células gigantes multinucleadas. Método estreptavidina ligada à peroxidase, cromógeno DAB: Obj. 40x.



Dos suínos, foram diagnosticados 57 casos de linfadenite granulomatosa. Dentre as amostras remetidas para exame anatomopatológico, machos e fêmeas com idade de 170-175 dias (exceto um animal, com aproximadamente 150 dias) foram provenientes de abatedouros/frigoríficos. Os órgãos enviados para a análise foram linfonodos mesentéricos e submandibulares.

Histologicamente, as lesões dos suínos eram constituídas por áreas de necrose caseosa, multifocais a coalescentes ou extensas, com calcificação distrófica acentuada, multifocal, circundadas por inflamação granulomatosa de intensidade variada contendo macrófagos, abundantes células epitelioides, escassa a moderada quantidade de células gigantes do tipo Langhans, eosinófilos e linfócitos (**Figura 8**). Circundando e/ou entremeada à inflamação havia proliferação de tecido conjuntivo fibroso, formando, em alguns casos, extensas áreas de fibrose (**Figura 9**). A magnitude das lesões variava entre os casos, com pequenos focos até áreas extensas a ponto de afetar todo o linfonodo.

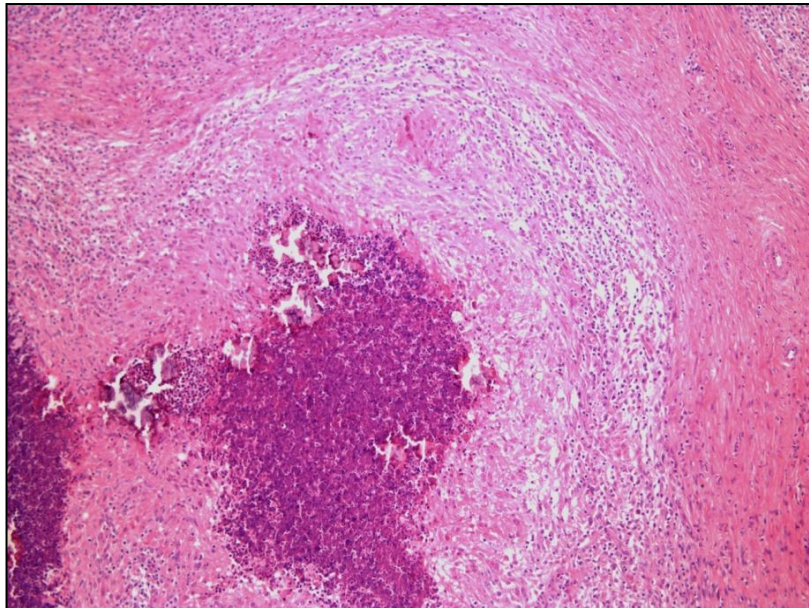


Figura 8. Linfadenite granulomatosa em suíno. Necrose caseosa central cercada por inflamação granulomatosa, circundada por TCF. HE: Obj. 10x.

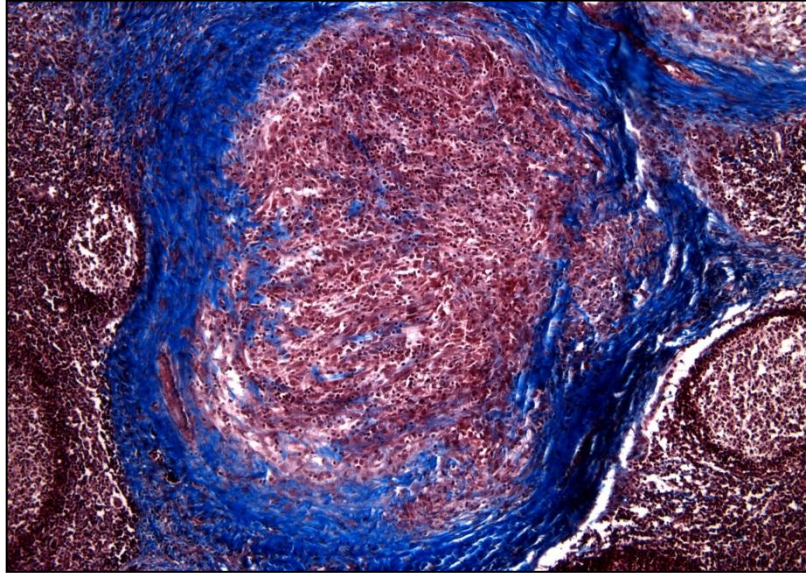


Figura 9. Linfadenite granulomatosa em suíno. Tecido conjuntivo fibroso (em azul) circundante e entremeado à inflamação granulomatosa. TM: Obj. 10x.

Na coloração histoquímica de Ziehl Neelsen foram observadas abundantes quantidades de bacilos álcool-ácido resistentes, livres, circundando e amplamente distribuídos nas áreas de necrose (**Figura 10**).

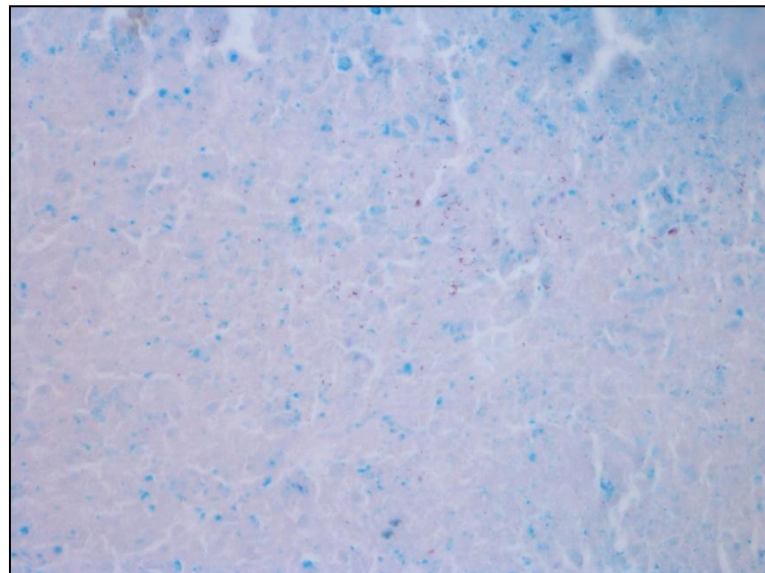


Figura 10. Linfadenite granulomatosa em suíno. BAAR (corados em rosa) em áreas de necrose caseosa. ZN: Obj. 40x.

Para a caracterização do infiltrado linfocitário nas amostras dos suínos, foram selecionados aleatoriamente 15 (25%) casos de linfadenite granulomatosa. Na avaliação da proporção de linfócitos T, através da técnica de IHQ (anti-CD3), houve marcação positiva em 62% dos linfócitos, considerando a média dos 5 campos avaliados em cada um dos 15 casos e, para os linfócitos B (antiCD79 $\alpha$ c) verificou-se média de 38% dos linfócitos com marcação

positiva. Houve maior proporção de linfócitos T nas lesões de todas as amostras avaliadas, exceto em 2 casos, em que a marcação entre linfócitos T e B foi equilibrada ou ocorreu em menor proporção (**Figura 11 e 12**).

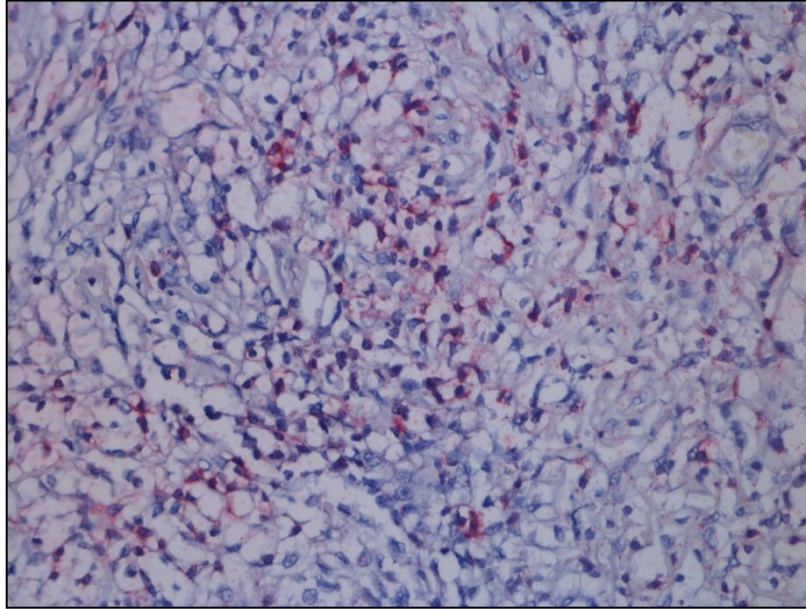


Figura 11. Linfadenite granulomatosa em suíno. Marcação positiva de linfócitos T (anti-CD3). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, cromógeno Permanent Red: Obj. 40x.

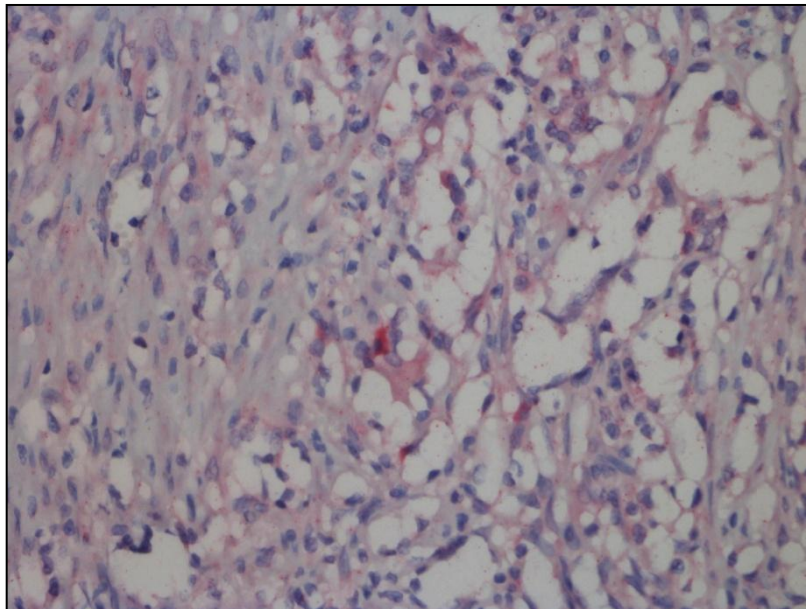


Figura 12. Linfadenite granulomatosa em suíno. Marcação positiva para linfócitos B (anti-CD79acy). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, cromógeno Permanent Red: Obj. 40x.

A marcação com o anticorpo *Mycobacterium tuberculosis* foi positiva em todos os casos (Figura 13). Houve marcação evidente em áreas de necrose e adjacentes, áreas estas em que foram também demonstrados bacilos através da coloração de ZN. No entanto, a marcação imuno-histoquímica se mostrou mais intensa, quantitativa e qualitativamente, em comparação

com a coloração de ZN. O uso do anticorpo Lisozima marcou abundantes quantidades de células epitelioides, células gigantes, macrófagos, porém, outras células inflamatórias também mostraram marcação positiva (**Figura 14**).

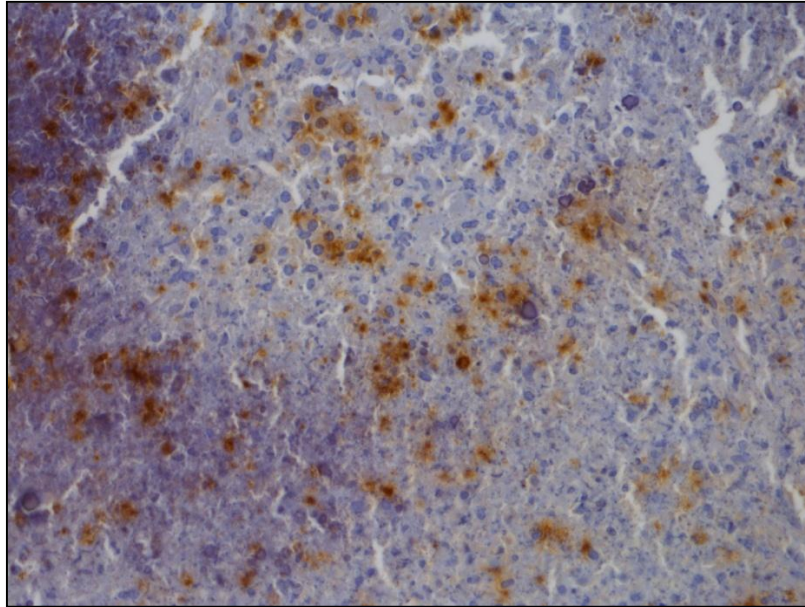


Figura13. Linfadenite granulomatosa em suíno. Marcação positiva para o anticorpo Mycobacterium tuberculosis. Método estreptavidina ligada à peroxidase, cromógeno DAB: Obj. 40x.

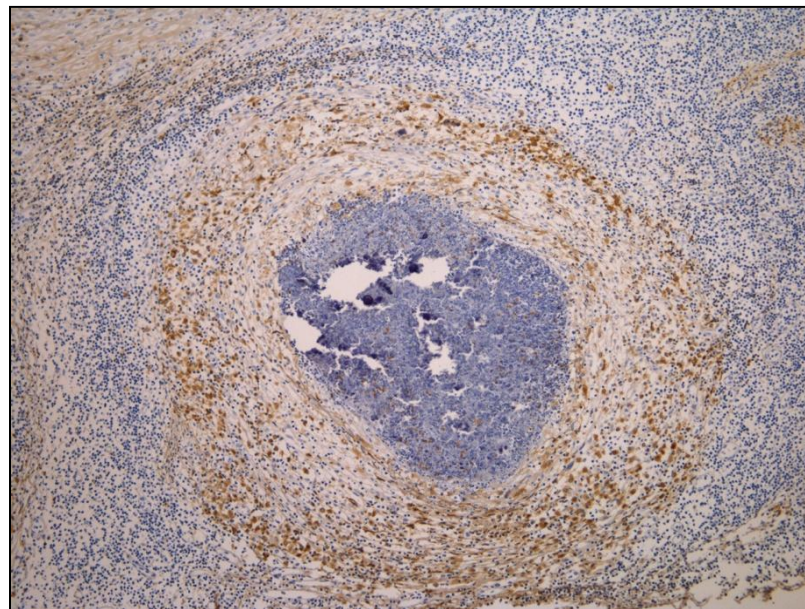


Figura 14. Linfadenite granulomatosa em suíno. Células inflamatórias marcadas com anticorpo Lisozima. Método estreptavidina ligada à peroxidase, cromógeno DAB: Obj. 10x.

#### 4. DISCUSSÃO

As lesões histológicas induzidas por bactérias do gênero *Mycobacterium* apresentam semelhanças entre bovinos e suínos, no entanto, algumas diferenças são significativas na análise de cortes corados com HE. Em bovinos, células gigantes do tipo Langhans foram abundantes enquanto em suínos predominaram células epitelioides e células gigantes eram escassas nas lesões.

Em várias das lesões dos suínos havia também infiltrado de eosinófilos, não observado nos bovinos. HIBIYA et al. (2008) observaram também maior frequência de eosinófilos em infecções por MAC em suínos do que em outras espécies.

As características histológicas e a variação nas proporções dos componentes celulares das lesões fornecem uma noção sobre o tempo de evolução da doença. Em bovinos infectados experimentalmente, as lesões pulmonares iniciais uma semana após inoculação consistem de aglomerados de macrófagos intra-alveolares, neutrófilos necróticos, células gigantes, poucos linfócitos e BAAR (CASWELL & WILLIAMS, 2007; BEYTUT, 2011). Duas semanas após infecção, que corresponde ao início da resposta proliferativa de linfócitos, há tubérculos contendo agregados centrais de neutrófilos circundados por macrófagos epitelioides. A necrose central aparece três semanas após infecção e a mineralização inicia por volta de cinco. O tecido fibroso aumenta com o tempo e tende a ser mais proeminente em indivíduos e espécies com grande resistência (CASWELL & WILLIAMS, 2007). Em nosso estudo foram encontrados casos com quantidades variadas de TCF, desde escasso, entremeado à inflamação até grandes quantidades de tecido fibroso, circundando as lesões. À medida que as áreas centrais de necrose caseosa aumentam em granulomas avançados, o infiltrado linfocitário diminui e fica localizado às margens da cápsula fibrosa (BEYTUT, 2011). PALMER et al. (2007) observaram alterações semelhantes em infecção experimental com *M. bovis*, quando classificaram a doença em quatro estágios de evolução, de acordo com o período pós-inoculação.

HIBIYA et al. (2008) classificaram lesões granulomatosas sistêmicas, observadas em órgãos de suínos abatidos, em três estágios de evolução, conforme os componentes da lesão. Lesões iniciais caracterizadas por reação exsudativa com células epitelioides, linfócitos, eosinófilos e células gigantes do tipo Langhans dão espaço a reações proliferativas com encapsulamento, até o aparecimento de granulomas mistos, com calcificação e fibrose em alta prevalência. No presente estudo, os três estágios de evolução foram observados.

Há diferença significativa na quantidade de BAAR nas lesões. Em bovinos foi encontrado um pequeno número de bacilos, em alguns casos localizados preferencialmente no citoplasma de células gigantes e, em outros casos, livres nas áreas de necrose, ou ambos. Outros estudos indicam que lesões em estágios iniciais apresentam moderado a grande número de BAAR, localizados em macrófagos e células gigantes multinucleadas. Em estágios mais avançados, a localização passa a ser extracelular, em meio a necrose caseosa e, raramente, no interior de macrófagos ou células gigantes multinucleadas (PALMER et al., 2007; BEYTUT, 2011). O achado de bacilos escassos é mais sugestivo de tuberculose bovina do que micobacteriose causada por *M. avium* (CASWELL & WILLIAMS, 2007). Em dois casos do estudo foi verificada abundante quantidade de BAAR, livres e no citoplasma de macrófagos e de células gigantes. Diferença em relação ao tamanho dos bacilos também foi verificada; nesses dois casos os bacilos eram mais alongados e evidentes, que sugere infecção por *M. avium*. A marcação através da IHQ também foi acentuada nestes casos, em áreas de necrose e em células gigantes e macrófagos.

Já, em suínos, há abundantes BAAR, livres, em áreas de necrose ou circundando-as. Isto pode ser explicado pelo fato de infecções por MAC serem muito mais comuns em suínos, e lesões por micobactérias atípicas apresentarem número mais elevado de microrganismos do que em infecções por bacilos tuberculosos. A marcação imuno-histoquímica com uso do anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis* foi mais evidente nas áreas de necrose, principalmente no citoplasma de macrófagos degenerados. MORÉS et al. (2007) fizeram observações semelhantes, em testes de IHQ utilizando como anticorpo primário *Mycobacterium avium*.

A detecção de bacilos álcool-ácido resistentes é muito importante para o diagnóstico das infecções induzidas por bactérias do gênero *Mycobacterium*, principalmente em suínos, nos quais pode ocorrer linfadenite por bactérias Gram positivas, como *Rhodococcus equi*, em linfonodos da região cervical e que provocam lesões macroscópicas e microscópicas semelhantes. KOMIJN et al. (2007), verificaram alta prevalência de infecções por *Rhodococcus equi* em linfonodos submaxilares de suínos abatidos com lesões granulomatosas, sugerindo ser *R. equi* a maior causa de diagnóstico falso-positivo de infecções por micobactérias na inspeção de suínos abatidos. Em recente estudo realizado no Brasil, *Mycobacterium* spp. (24.1%) e *R. equi* (13.2%) foram os microrganismos mais prevalentes em suínos com linfadenite (LARA et al., 2011).

Quanto ao infiltrado linfocitário nas lesões de tuberculose de bovinos, linfócitos T são predominantes (**Tabela 2**). Na média do total de células marcadas, linfócitos T

corresponderam a 61,35% de células com marcação positiva. Outros estudos que caracterizam o perfil de linfócitos T e sua distribuição nas lesões de tuberculose bovina mostram patamares semelhantes (LIEBANA et al., 2007; PALMER et al., 2007; BEYTUT, 2011). Conforme BEYTUT (2011), linfócitos CD3+ T são abundantes no início de granulomas, quando não há ainda necrose central. À medida que aumenta o tamanho do granuloma os linfócitos são deslocados para a periferia e ficam localizados nas bordas da cápsula fibrosa do granuloma. Em granulomas avançados, células T são comumente detectadas na zona marginal, internamente à cápsula fibrosa. Em granulomas avançados com calcificação central, o número de linfócitos CD3+ T diminui acentuadamente e se acumula na zona subcapsular, nas margens do granuloma. Assim como linfócitos T, linfócitos B são comumente detectados em áreas subcapsulares de granulomas avançados.

O infiltrado inflamatório linfocitário em lesões por *Mycobacterium* sp. de suínos foi semelhante ao dos bovinos, com predomínio de linfócitos T (**Tabela 3**), evidenciado pela média de 62% dos linfócitos com marcação positiva pelo anticorpo anti-CD3, o que caracteriza resposta imune do tipo celular esperada em infecções por bactérias álcool-ácido resistentes. Este é o primeiro estudo que verifica o perfil dos linfócitos em infecções por *Mycobacterium* sp. de suínos através da técnica da imuno-histoquímica.

Tabela 2. Média dos cinco campos microscópicos avaliados em lesões de tuberculose para caracterização do infiltrado linfocitário (linfócitos T, marcados com anticorpo Anti-CD3; e linfócitos B, com marcação positiva para o anticorpo Anti-CD79 $\alpha$ cy) em bovinos.

Bovinos	Órgão com lesão	Anti-CD3	Anti-CD79 $\alpha$ cy
<b>AP-3029-07</b>	Pulmão	3	1
<b>AP-4287-07</b>	Linfonodo	2	2
<b>N-1122-07</b>	Linfonodo	3	1
<b>AP-178-08</b>	Linfonodo	2	2
<b>AP-3135-08</b>	Linfonodo	3	1
<b>AP-363-09</b>	Linfonodo	3	1
<b>AP-1726-09</b>	Linfonodo	2	2
<b>AP-1726-09</b>	Pulmão	2	2
<b>AP-3346-09</b>	Pulmão	3	1
<b>AP-411-11</b>	Linfonodo	2	2
<b>AP-411-11</b>	Pulmão	2	2
<b>AP-2135-11</b>	Linfonodo	3	1
<b>AP-2431-11</b>	Linfonodo	2	2
<b>AP-3176-11</b>	Linfonodo	3	1
<b>AP-3176-11</b>	Pulmão	1,74	2,26
<b>AP-4499-11</b>	Linfonodo	2	2
<b>AP-3690-11</b>	Linfonodo	3	1
<b>AP-3690-11</b>	Pulmão	3	1
<b>N-59-11</b>	Linfonodo	2	2

Tabela 3. Média dos cinco campos microscópicos avaliados em linfonodos com lesões granulomatosas por *Mycobacterium* sp. para caracterização do infiltrado linfocitário (linfócitos T, marcados com anticorpo Anti-CD3; e linfócitos B, com marcação positiva para o anticorpo Anti-CD79 $\alpha$ ) em suínos.

Suínos	Anti-CD79 $\alpha$	Anti-CD3
AP-4143-08	1,65	2,35
AP-4521-11	1,4	2,6
AP-3896-11	1,2	2,8
AP-3245-11	1,3	2,7
AP-3178-11	1,5	2,5
AP-3250-11	1,6	2,4
AP-3311-11	1,7	2,3
AP-2908-11	1,4	2,6
AP-4021-11	1,8	2,2
AP-3897-11	1,14	2,86
AP-3623-11	1,3	2,7
AP-2971-11	1,7	2,3
AP-3246-11	1	3
AP-3249-11	2,1	1,9
AP-4308-11	2	2

A imunidade em infecções por micobactérias é essencialmente mediada por célula e dependente de uma complexa interação entre linfócitos T e macrófagos. As características estruturais de *Mycobacterium* são responsáveis pela indução deste tipo de resposta imune. (CASWELL & WILLIAMS, 2007; LIEBANA et al., 2007; VELÁZQUEZ et al., 2011).



## 5. CONCLUSÃO

As lesões formadas na infecção por bactérias do gênero *Mycobacterium* sp. tem semelhanças nas espécies bovina e suína, no entanto, em bovinos a inflamação granulomatosa é marcada por abundantes células gigantes, enquanto que em suínos predominam macrófagos epitelioides. Em suínos são também verificados eosinófilos, ausentes ou escassos nos granulomas tuberculoides em bovinos.

A quantidade de microrganismos em lesões varia de acordo com a espécie de *Mycobacterium* envolvida da infecção. Lesões por MAC costumam apresentar número elevado de bacilos, enquanto que, em lesões induzidas por bacilos tuberculosos, são raros os bacilos encontrados nas lesões. A localização dos bacilos também difere, caracterizada por bacilos intracelulares no citoplasma de macrófagos e de células gigantes e em áreas de necrose caseosa em bovinos, para bacilos livres, dispersos nas áreas de necrose e adjacentes a elas em suínos.

O perfil de linfócitos é semelhante entre as espécies, com predomínio de linfócitos T em relação a linfócitos B, o que caracteriza a resposta imune do tipo celular, essencial em infecções provocadas por micobactérias.

## REFERÊNCIAS

- BEYTUT, E. Immunohistochemical evaluation of surfactant proteins and lymphocyte phenotypes in the lungs of cattle with natural tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 119-124, 2011.
- CASWELL, J. L. & WILLIAMS, K.J. Respiratory system. In: MAXIE, M.G. (ed) **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals**. 5.ed. Edinburgh: Elsevier, 2007. v. 2, cap. 5, p. 523-653.
- COETZER, J. A.W. & TUSTIN, R.C. (ed) **Infectious diseases of livestock**. 2. ed. Cape Town: Oxford, 2004. v. 3, section 5: Bacterial diseases.
- HIBIYA, K. et al. Histopathological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. **Comparative Immunology, Microbiology e Infectious Diseases**, v. 31, p. 347-366, 2008.
- HIBIYA, K. et al. Descriptive analysis of the prevalence and the molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* complex-infected pigs that were slaughtered on the main island of Okinawa. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 401-421, 2010.
- INGEN, J. V. et al. Isolation of mycobacteria other than *Mycobacterium avium* from porcine lymph nodes. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 250-253, 2010.
- IWAKIRI, A. et al. Lymphoproliferative Responses in Pigs Infected with *Mycobacterium avium*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, n.7, p. 827-829, 2001.
- KOMIJN, R. E. et al. Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 352-357, 2007.
- LARA, G. H. B. et al. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 185-188, 2011.
- LIEBANA, E. et al. Distribution and activation of T-lymphocyte subsets in tuberculous Bovine Lymph-node Granulomas. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 366-372, 2007.
- MATLOVA, L. et al. Distribution of *Mycobacterium avium* Complexes Isolates in Tissue Samples of Pigs Fed Peat Naturally Contaminated with Mycobacteria as a Supplement. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1261-1268, 2005.
- MORÉS, N. et al. Linfadenite granulomatosa em suínos: linfonodos afetados e diagnóstico patológico da infecção causada por agentes do Complexo *Mycobacterium avium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n.1, p. 13-17, 2007.

- NUGENT, G. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host complexes: A New Zealand case study. **Veterinary Microbiology**, v.151, p.34-42, 2011.
- PALMER, M. V.; WATERS, W. R.; THACKER, T. C. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Pathology**, v.44, p. 863-874, 2007.
- RADOSTITS, O. M. et al. Diseases associated with bacteria – IV. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary medicine**. 10. ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2007. cap. 19, p. 1007-1017.
- SCHILLER, I. et al. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. **Veterinary Microbiology**, v.151, p. 153-159, 2011.
- SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone editorial, 2007. p. 148-153.
- STEPANOVA, H. et al. Cell-mediated immune response in swine infected with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, p.107-112, 2011.
- THAKUR, A. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. **Indian Journal Microbiology**, v. 51, 2011.
- THOEN, C. O. Tuberculosis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**. 9. ed. Victoria: Blackwell Publishing Ltd, 2006. Cap. 49, p. 807-816.
- VELÁZQUEZ, U. C.; CORTÉS, E. A.; PABELLO, J. A. G. Alternative activation modifies macrophage resistance to *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 151, p. 51-59, 2011.