

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LINFADENITE GRANULOMATOSA EM SUÍNOS NO BRASIL:
CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MICOBACTÉRIAS IDENTIFICADAS

ANA PAULA MORI

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LINFADENITE GRANULOMATOSA EM SUÍNOS NO BRASIL:
CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MICOBACTÉRIAS IDENTIFICADAS

ANA PAULA MORI

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Patologia Animal e Patologia Clínica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Orientador: Prof. Dr. David Driemeier
Coorientadora: Dr^a. Jalusa Deon Kich

PORTO ALEGRE

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

CIP - Catalogação na Publicação

Mori , Ana Paula
Linfadenite Granulomatosa em suínos no Brasil:
Caracterização histopatológica e micobactérias
identificadas / Ana Paula Mori . -- 2019.
57 f.
Orientador: David Driemeier.

Coorientadora: Jalusa Deon Kich.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Linfadenite Granulomatosa . 2. Suínos . 3. Caracterização histopatológica . 4. Hibridização in Situ Fluorescente. 5. Reação em Cadeia da Polimerase . I. Driemeier, David, orient. II. Deon Kich, Jalusa, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sonia e Ademar Mori, pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Gratidão eterna a Deus pela vida, por todas as maravilhas que me cercam e por cada dificuldade encontrada nesta caminhada. Dificuldades estas que favoreceram para o meu crescimento profissional, pessoal e espiritual. Aos amigos de luz por me guiarem e me protegerem em todos os momentos da minha vida.

Este trabalho não seria o mesmo sem o auxílio e disposição de muitas pessoas, por isso gostaria de agradecer a todos que participaram desta jornada:

Ao meu orientador David Driemeier, por ter me dado à oportunidade de ser sua orientada, pelos seus ensinamentos e por ter permitido o trabalho em conjunto com a EMBRAPA – Suínos e Aves.

Aos professores Luciana Sonne e Saulo Pavarini pela paciência e ensinamentos. À Marcele Bettim Bandinelli, pelo seu entusiasmo e paciência, a Barbara Krebs por suas lâminas maravilhosas, a Cíntia de Lorenzo por todas as imuno-histoquímicas e pela ótima energia, ao Matheus Bianchi pelo auxílio com as fotos deste trabalho e a Lauren Mello pelo apoio técnico computacional e por sempre estar disposta a auxiliar. As amigas Tainã Normanton Guim e Susy Hermes, muito obrigada pelo carinho e apoio.

À toda equipe EMBRAPA-Suínos e Aves, principalmente ao setor de sanidade. À equipe da Patologia, Marcos Morés muito obrigado pela paciência e apoio nas incontáveis tentativas com a FISH, assim como conhecimentos compartilhados em leitura de lâminas, sua conduta profissional é um exemplo. Ao pesquisador Nelson Morés pela oportunidade, pelo exemplo de profissionalismo e pelos ensinamentos relacionados à patologia e a suinocultura. À equipe das micobactérias, Dr. José Rodrigo Pandolfi e Beatris Kramer pelos ensinamentos na área de cultivo e isolamento de micobactérias, assim como pelos resultados da PCR. À pesquisadora Virgínia Santiago Silva pela oportunidade de conhecer um pouco mais sobre javalis, pela paciência e confiança. E principalmente a minha Coorientadora Jalusa Deon Kich, que me inspira pela mulher e pela profissional que é. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos, pela paciência e pelo carinho. Aos amigos que cruzaram meu caminho e tornaram os dias mais leves e descontraídos: Caroline Marinho, Kamilla do Karmo, Igor Savoldi, equipe Genética, Guilherme Cezar, Mariana Meneguzzi, Vânia Bourckhardt e Josiane Bispo.

À Ana Maria Magnani pela companhia e ótima convivência por mais de um ano, obrigada por me ensinar a amar Porto Alegre.

Aos amigos distantes, mas sempre presentes, Marina Thomaz, Raquel Alves e Luana Barthel meu eterno carinho e gratidão por poder compartilhar minha vida com vocês. À Amanda ZoletRigo e Javier BarreraZarate pela amizade, risadas, apoio constante e auxílio na correção do trabalho.

E por último, porém não menos importante a minha família. Aos meus pais pelo apoio incondicional tornando possível a realização dos meus sonhos, sempre me proporcionando o melhor. Pelo amor e confiança depositados em mim e por me ensinarem que mais do que palavras, as atitudes são o que definem o seu caráter.

Ao meu noivo por me apoiar e estar presente, mesmo longe, em todos os momentos de comemorações ou de adversidades. Por me lembrar que existe muito mais do que aquilo que nos rodeia, e que a vida vale a pena mesmo, quando você compartilha ela com quem te ama.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

EPÍGRAFE

“If you’re not failing every now and again, it’s a sign you’re not doing anything very innovative.”

Woody Allen

RESUMO

Entre os anos 2012 e 2014, a linfadenite granulomatosa (LG) em suínos representou 99% de todas as lesões associadas a zoonoses nos frigoríficos brasileiros. O *Mycobacterium avium hominissuis* (MAH) é a principal subespécie das micobactérias associada à LG em suínos, com raros casos atribuídos as micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. As lesões macroscópicas, histopatológicas e técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) não definem a espécie de micobactéria envolvida na LG. O padrão ouro de diagnóstico é o isolamento de micobactérias, seguido de técnicas moleculares. Este estudo teve como objetivo pesquisar a etiologia da LG no Brasil para atualizaros dados nacionais, e padronizar a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) em linfonodos parafinizados de suínos com LG. No ano de 2017 o Serviço de Inspeção Federal (SIF) coletou em 19 frigoríficos, 637 linfonodos de suínos com lesões granulomatosas, com origem em oito estados brasileiros. As amostras foram submetidas a exame histopatológico, técnica histoquímica de ZN, isolamento de micobactérias, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e FISH. De acordo com o conhecimento dos autores esta é a primeira tentativa descrita na literatura de padronização da técnica de FISH em tecidos parafinizados de suínos. A lesão histopatológica granulomatosa foi observada em 85,1% dos tecidos linfoides. A taxa de isolamento de micobactérias foi de 32,08% (128/399), destas 76,56% (98/128) origens foram positivas para MAH, 1,56% (2/128) origens positivas para *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), 21,87% (28/128) origens positivas e 10 origens negativas para o gênero *Mycobacterium* spp. Observou-se bacilos-álcool ácido resistentes (BAAR) em 71,7% das amostras de MAH, em 75% das amostras de *Mycobacterium* spp., e em uma amostra (1/3) *M. bovis*. Das amostras positivas para BAAR no tecido, 60,47% não isolaram ou foram negativas na técnica da PCR para *Mycobacterium* spp. A FISH não apresentou resultados positivos em linfonodo parafinado de suínos. O MAH foi à subespécie mais diagnosticada na LG em suínos do Brasil, com apenas duas origens positivas para *M. bovis*. Os resultados obtidos neste estudo ficam a disposição para análises de risco, para subsidiar políticas públicas relacionadas à inspeção assim como programas de vigilância de tuberculose suína.

Palavras chaves: Tuberculose suína, Hibridização *in situ*, granuloma, técnicas diagnósticas, BAAR.

ABSTRACT

Granulomatous lymphadenitis (GL) in pigs represents 99% of all lesions associated with zoonoses in Brazilian slaughterhouses between 2012 and 2014. *Mycobacterium aviumhominissuis*(MAH) is the main subspecies of mycobacteria associated with GL in pigs, and few cases are attributed to the Complex *Mycobacterium tuberculosis*.The macroscopic, histopathological and Ziehl-Neelsen (ZN) lesions do not define the mycobacterial species involved in GL. The isolation of mycobacteria is the gold standard for diagnosis.Molecular techniques are also used for subspecies determination. The aim of this study was to investigate the etiology of granulomatous lesions for the validation of national data regarding this lesion in pigs and to standardize a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) test in formalin-fixed lymph nodes with granulomatous lesions. In 2017, federal veterinary meat inspectors collected 637 mesenteric lymph nodes with granulomatous lesions from 19 slaughterhouses.Granulomatous histopathological lesions were observed in 85.1% of the lymphoid tissues. The isolation rate of mycobacteria was 32.08%, of these isolates 76.56%wereMAH positive, 1.56% for *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)and21,87% for *Mycobacterium* spp.Acid-alcohol resistant bacillus (BAAR) was observed in 71.7% of the MAH samples, in 75% of the samples of *Mycobacterium*spp, and in one sample of *M. bovis*. The standardization of the FISH technique in formalin-fixed porcine lymph nodes was unsuccessful. MAH was the most diagnosed subspecies involved in GL in pigs, with only two positive for *M. bovis*. The results of this study are available for risk analysis to support inspection-related public policies as well as swine tuberculosis surveillance programs.

Keywords: swine tuberculosis, *in situ* hibridization, granuloma, diagnostic methods, BAAR.

LISTA DE ABREVIATURAS

Bacilos álcool-ácidos resistentes	BAAR
Circovírus suíno tipo 2	PCV2
Complexo <i>Mycobacterium avium</i>	MAC
Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	CMtb
Goiás	GO
Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente	FISH
Imuno-histoquímica	IHQ
Laboratório de biossegurança nível-3	NB3
Linfadenite Granulomatosa	LG
Mato Grosso	MT
Mato Grosso do Sul	MS
Micobactérias Não-tuberculosas	MNT
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>M. avium</i>
<i>Mycobacterium avium avium</i>	MAA
<i>Mycobacterium avium hominissuis</i>	MAH
<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>	MAP
<i>Mycobacterium avium silvaticum</i>	MAS
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>M. bovis</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Minas Gerais	MG
Paraná	PR
Reação em Cadeia da Polimerase	PCR
Rio Grande do Sul	RS
Santa Catarina	SC
São Paulo	SP
Serviço de Inspeção Federal	SIF
Ziehl-Neelsen	ZN

SUMÁRIO

Sumário

INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO DE LITERATURA	11
Micobactérias.....	11
Micobactérias não-tuberculosas	11
Micobactérias na suinocultura	12
Diagnóstico.....	12
Micobactérias em humanos e em suínos	13
ARTIGO	14
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
Conclusões:.....	45
Propostas de projetos futuros:	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

INTRODUÇÃO

A inspeção veterinária de carcaças em frigoríficos tem como principal objetivo garantir ao consumidor alimentos saudáveis de origem animal. O sistema de inspeção utilizado no Brasil a mais de um século, é baseado no sistema de "*Handbuch der Fleischbeschau*" de Robert Von Ostertag, que utiliza exames de visualização, palpação e incisão da carcaça e vísceras, eficaz contra os perigos considerados clássicos (gênero *Mycobacterium* e as parasitoses zoonóticas) (Ghidini et al., 2018). Em contrapartida, nos últimos anos é evidente a mudança do cenário sanitário nos rebanhos suínos brasileiros, resultado da intensificação aliada a tecnificação da produção. Portanto a modernização da inspeção sanitária no Brasil se faz necessária para adequar os procedimentos adotados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) à atual realidade epidemiológica da suinocultura (COLDEBELLA et al., 2017; COSTA et al., 2017).

Para tanto, foi realizado um projeto com planos de ação estrategicamente relacionados, iniciando pelo estudo dos dados nacionais registrados pelo SIF, seguido por uma análise qualitativa de risco que identificou e classificou os perigos relacionados aos produtos suínos in natura, originados da suinocultura industrial tecnificada (COLDEBELLA et al., 2017; COSTA et al., 2017). Entre os perigos estudados, 23 foram considerados relevantes (COSTA et al., 2017), dentre estes: Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) e Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb). Entre os anos de 2012 e 2014, o SIF registrou 0,81% de condenações por linfadenite nos frigoríficos, prevalência que representou 99% de todas as lesões associadas a zoonoses (COLDEBELLA et al., 2017). O MAC foi classificado como perigo biológico de baixo, e o CMtb muito baixo em função da frequência em que ocorrem na população suína (COSTA et al., 2017).

A linfadenite granulomatosa (LG) em suínos é uma doença subclínica, causada principalmente por micobactérias não-tuberculosas (MNT). A subespécie *Mycobacterium avium hominissuis*, pertencente ao MAC, é a micobactéria prevalente em suínos e em humanos (MIJS et al., 2002; AGDESTAIN et al., 2012; STROMEVORA; FALDYNA, 2018). Na LG suína, raros são os casos atribuídos ao *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* (SCHWARZ et al., 2002; CARDOSO, 2009). Os animais infectados são detectados apenas na linha de abate, causando prejuízos devido ao descarte de vísceras e carcaças (MORÉS et al., 2007). Estudo realizado por Martins et al. (2002) estimou o impacto econômico da LG na região Sul do Brasil em 5,8, 7,0 e 8,0 milhões de reais nos anos 1997,

1998 e 1999, respectivamente. As lesões granulomatosas são observadas principalmente nos linfonodos mesentéricos, contudo, linfonodos cefálicos e mediastinais também podem estar acometidos (MORÉS *et al.*, 2007). As lesões macroscópicas e histopatológicas são insuficientes para a definição do patógeno envolvido, necessitando da realização do isolamento de micobactérias, associado a técnicas moleculares para um diagnóstico mais acurado (MORÉS *et al.*, 2007; LARA *et al.*, 2011; FORBES *et al.*, 2018). Contudo, o isolamento de micobactérias é uma técnica considerada lenta, cara, complicada e sua sensibilidade é questionável (TIRKKONEN, 2017).

Com base na permanência das micobactérias na priorização de risco e a frequência de ocorrência registrada pelo SIF, além do crescente interesse sobre a relação das micobactérias na produção animal e saúde humana, este trabalho teve como objetivo pesquisar a etiologia e as lesões histopatológicas das lesões granulomatosas detectadas na linha de abate de suínos para atualização dos dados nacionais e retro alimentar análises de risco. Além disso, visou padronizar a técnica de FISH em linfonodos parafinizados de suínos com LG, com o objetivo de obter um método diagnóstico mais sensível, simples e rápido para detecção de micobactérias.

REVISÃO DE LITERATURA

Micobactérias

O gênero *Mycobacterium* é representado por mais de 150 espécies de bacilos álcool-resistentes (BAAR), aeróbicos, não formadores de esporos, imóveis, que podem se apresentar como micobactérias saprófitas ambientais, invasores oportunistas ou patógenos obrigatórios. O gênero ainda pode ser dividido em quatro grandes grupos, conforme a epidemiologia, habilidade de crescimento “in vitro” e associação com afecções, são eles: Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb), micobactérias não-tuberculosas (MNT), *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium ulcerans* (TIRKKONEN, 2017; FORBES *et al.*, 2018).

Micobactérias não-tuberculosas

Também conhecidas como micobactérias atípicas ou micobactérias ambientais, abrangem um vasto grupo de organismos de característica ubíqua. Portanto, podem ser encontradas no ambiente, incluindo águas naturais, sistemas de distribuição de água, poeira, assim como nos próprios animais (FALKINHAM, 2009; KRIZOVA *et al.*, 2010). A parede celular composta por peptidoglicolípídios possui quatro camadas e confere à bactéria característica hidrofóbica e resistência ao meio ambiente, assim como a desinfetantes e antibióticos (BRITO, 2013; FORBES *et al.*, 2018). Algumas espécies de micobactérias são capazes de formar biofilmes, e sugere-se que esta característica esteja relacionada com o seu potencial infeccioso (JOHANSEN *et al.*, 2009). A frequência das MNT em humanos tem aumentado nos últimos anos e os principais grupos afetados são crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos (FALKINHAM, 2009; POLAČEK; ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, 2016; FORBES *et al.*, 2018). Entre as micobactérias presentes no grupo MNT, o Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) abrange espécies consideradas patógenos oportunistas. O MAC é composto por quatro subespécies, *Mycobacterium avium avium* (MAA), *Mycobacterium avium silvaticum* (MAS), *Mycobacterium avium hominissuis* (MAH) e *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) (MORAVKOVA *et al.*, 2008; RINDI; GARZELLI, 2014).

Micobactérias na suinocultura

O *MAH* é a subespécie do *MAC*, mais relatada em humanos e na linfadenite granulomatosa em suínos (MIJS *et al.*, 2002; AGDESTSTEIN *et al.*, 2011; AGDESTSTEIN *et al.*, 2012). A forma de apresentação da doença em suínos é subclínica, e as lesões são apenas detectadas na linha de abate, acarretando em perdas econômicas pelo descarte de vísceras e carcaças (MARTINS *et al.*, 2002; PAVLIK *et al.*, 2003). A principal rota de infecção em suínos é a fecal-oral, e os principais linfonodos acometidos são os mesentéricos. Linfonodos retrofaríngeos, submaxilares, cervicais e, raramente, os mediastinais, também podem apresentar lesões granulomatosas (MORÉS *et al.*, 2007). Poucos são os relatos de outras formas de apresentação da doença em suínos, como desordens reprodutivas, infecções em fetos abortados, aumento dos índices de mortalidade e animais refugos (ELLSWORTH *et al.*, 1979; WELLENBERG *et al.*, 2010; EISENBERG *et al.*, 2012). Agdestein *et al.* (2012; 2014) demonstraram maior disseminação do *MAH* pelas fezes que a subespécie *MAA*, sugerindo este como um fator importante na transmissão do patógeno entre os animais, e justificando a prevalência e manutenção da pressão de infecção do *MAH* nas granjas. Diferentes cepas de *MAH* já foram encontradas em uma mesma granja, sugerindo que a fonte de contaminação seria diversa (DOMINGOS; AMADO; BOTELHO, 2009; WELLENBERG *et al.*, 2010). Serragem, turfa e, até mesmo, a água são algumas das possíveis fontes de contaminação (AGDESTSTEIN *et al.*, 2012; EISENBERG *et al.*, 2012). Relatos de infecções causadas pelas micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb) em suínos são escassos na literatura (SCHWARZ *et al.*, 2002; CARDOSO, 2009). Barandiaran *et al.* (2015) demonstraram coinfeção entre *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e *Mycobacterium avium* em 20 amostras de suínos de abate; contudo, na Argentina, os casos de LG suína são atribuídos principalmente a *M. bovis*.

Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por micobactérias em suínos não é simples, tampouco rápido. Para suínos vivos, com o objetivo de diagnosticar o rebanho, o teste utilizado é o da tuberculinização, capaz de diferenciar entre infecções por *MAC* e por *M. bovis*. Contudo,

reações cruzadas são descritas, assim como a baixa sensibilidade do teste (MONAGHAM *et al.*, 1994; MORÉS *et al.*, 2006).

Os exames macroscópico e histopatológico não são suficientes para definição do agente etiológico envolvido, sejam micobactérias ou outros patógenos, como o *Rhodococcus equi* (MORÉS *et al.*, 2007; LARA *et al.*, 2011). A técnica de histoquímica de Ziehl-Neelsen (ZN) detecta BAAR, contudo resultados negativos na técnica não descartam a doença causada por micobactérias (SHITAYE *et al.*, 2006).

A classificação das micobactérias pode ser realizada com base nas características do isolamento, taxa de crescimento, produção de pigmento, reações bioquímicas e enzimáticas, porém, a dificuldade de interpretação de alguns isolados torna inviável a identificação do agente (GUNN-MOORE; JENKINS; LUCKE, 1996; TIRKKONEN, 2017).

O padrão ouro de diagnóstico é o isolamento do patógeno, mas a associação com técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase, se faz necessária para diferenciação entre espécies e subespécies de micobactérias. De qualquer forma, o isolamento de micobactérias além de ser trabalhoso, necessita no mínimo três semanas para a visualização das colônias, assim como a sensibilidade da técnica pode variar (MORÉS; OLIVEIRA, 2007; TIRKKONEN, 2017; OIE, 2018).

Micobactérias em humanos e em suínos

Micobactérias pertencentes ao MAC representam os patógenos oportunistas mais comuns em aidéticos (CAMPBELL, 2008) e até o momento, não são consideradas patógenos transmitidos por alimentos. Contudo, a teoria de que vísceras intestinais e carne suína possam ser fontes importantes de contaminação para humanos é discutida na literatura (AGDESTEIN, *et al.*, 2014; POLAČEK; ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, 2016). A relação genética entre cepas de micobactérias de amostras de humanos e suínos tem sido descrita, porém não está claro, ainda, se o suíno é origem de transmissão para o humano ou vice-versa, ou se ambos compartilham da mesma fonte de contaminação (KOMIJN *et al.*, 1999; MOBIUS *et al.*, 2006; TIRKKONEN *et al.*, 2007; TIRKKONEN *et al.*, 2010). Apesar do crescente interesse nas MNT, há pouca informação disponível nacionalmente.

ARTIGO

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “Linfadenite granulomatosa em suínos no Brasil: Caracterização histopatológica e micobactérias identificadas”.

O artigo será submetido para publicação a um periódico por identificar.

**Linfadenite Granulomatosa em suínos no Brasil:
Caracterização histopatológica e micobactérias identificadas.**

Ana Paula Mori¹, José Rodrigo Pandolfi², Beatris Kramer², Arlei Coldebella², Marcos Morés², Virginia Santiago Silva², Nelson Morés², Elenita Ruttscheidt Albuquerque³, Jalusa Deon Kich² & David Driemeier¹.

¹Setor de Patologia Veterinária (SPV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil. ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA- Suínos e Aves), Santa Catarina, Brasil. ³Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasil.

RESUMO

A modernização do sistema de inspeção de carnes no Brasil tem como objetivo adequar os procedimentos realizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) à atual realidade epidemiológica da suinocultura. Contudo, as mudanças nos procedimentos devem ser embasadas em estudos científicos sólidos e análise de risco. Entre os anos 2012 e 2014, a linfadenite granulomatosa (LG) em suínos representou 99% de todas as lesões associadas a zoonoses nos frigoríficos brasileiros. Na análise qualitativa de risco o Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) foi classificado como perigo biológico de baixo, e o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb) muito baixo em função da frequência em que ocorrem na população suína. A LG em suínos é causada principalmente pelas micobactérias do MAC, com raros casos atribuídos as micobactérias do CMtb. As lesões macroscópicas, histopatológicas e técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) não definem a espécie de micobactéria envolvida na LG. O padrão ouro de diagnóstico é o isolamento de micobactérias, seguido de técnicas moleculares. Considerando a frequência de ocorrência das micobactérias e a permanência das mesmas na priorização de risco, este estudo teve como objetivo pesquisar a etiologia da LG no Brasil. No ano de 2017, o SIF coletou em 19 frigoríficos, 637 linfonodos de suínos com lesões granulomatosas, com origem em oito estados brasileiros. As amostras foram submetidas a exame histopatológico, técnica histoquímica de ZN, isolamento de micobactérias, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). De acordo com o conhecimento dos autores, esta é a primeira tentativa de

padronização da técnica de FISH em tecidos parafinizados de suínos com linfadenite granulomatosa. A lesão histopatológica granulomatosa foi observada em 85,1% dos tecidos linfoides. A taxa de isolamento de micobactérias foi de 32,08% (128/399). Destas 76,56% (98/128) origens foram positivas para MAH, 1,56% (2/128) origens positivas para *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), 21,87% (28/128) origens positivas e 10 origens negativas para o gênero *Mycobacterium* spp. Observou-se bacilos-álcool ácido resistentes (BAAR) em 71,7% das amostras de MAH, 75% das amostras de *Mycobacterium* spp., e em uma (1/3) amostra de *M. bovis*. Das amostras positivas para BAAR no tecido, 60,47% não houve isolamento ou foram negativas na técnica da PCR para *Mycobacterium* spp. A FISH não apresentou resultados positivos em linfonodos parafinizados de suínos. O MAH foi à subespécie mais diagnosticada na LG em suínos do Brasil, com apenas duas origens positivas para *M. bovis*. Os resultados obtidos neste estudo ficam a disposição para análises de risco, para subsidiar políticas públicas relacionadas à inspeção assim como programas de vigilância de tuberculose suína.

Palavras chaves: Sistema de inspeção, tuberculose suína, Hibridização *in situ*, técnicas diagnósticas, BAAR.

INTRODUÇÃO

O evidente desenvolvimento da suinocultura brasileira nas últimas décadas, baseado em intensificação e tecnificação provocou mudanças na condição sanitária dos rebanhos. As novas condições reduziram por si a ocorrência de alguns patógenos zoonóticos e aumentaram de outros. Em contrapartida não houve adaptações na inspeção das carcaças realizada nos frigoríficos, que segue baseando-se em exames macroscópicos, que incluem palpações e incisões na busca de lesões características de zoonoses clássicas e infestações parasitárias. Portanto, a modernização da inspeção sanitária, se fez necessária para adequar os procedimentos realizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) à atual realidade epidemiológica da suinocultura (COLDEBELLA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2017).

Para tanto, foi realizado um projeto com planos de ação estrategicamente relacionados, iniciando pelo estudo dos dados nacionais registrados pelo SIF, seguido por uma análise qualitativa de risco que identificou e classificou os perigos relacionados aos produtos suínos in natura, originados da suinocultura industrial tecnificada (COLDEBELLA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2017). Entre os perigos estudados, 23 foram considerados relevantes (COSTA *et al.*, 2017), dentre estes: Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) e Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb). Entre os anos de 2012 e 2014, o SIF registrou 0,81% de condenações por linfadenite nos frigoríficos, prevalência que representou 99% de todas as lesões associadas a zoonoses (COLDEBELLA *et al.*, 2017). O MAC foi classificado como perigo biológico de baixo, e o CMtb muito baixo em função da frequência em que ocorrem na população suína (COSTA *et al.*, 2017).

A linfadenite granulomatosa (LG) suína é causada pelas micobactérias não-tuberculosas (MNT), principalmente as que compõem o MAC (STROMEVORA; FALDYNA, 2018). Raros são os casos atribuídos às espécies que compõem o CMtb: *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (SCHWARZ *et al.*, 2002; CARDOSO, 2009). A doença ocorre de forma subclínica nos animais, e é identificada apenas na linha de abate, acarretando perdas econômicas causadas pelo descarte de vísceras e carcaças (MARTINS *et al.*, 2002; MORÉS *et al.*, 2007; AGDESTEIN *et al.*, 2012). O complexo MAC é composto por quatro subespécies, *Mycobacterium avium avium* (MAA), *Mycobacterium avium silvaticum* (MAS), *Mycobacterium avium hominissuis* (MAH) e *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) (MORAVKOVA *et al.*, 2008; RINDI; GARZELLI, 2014). As subespécies MAA e MAH são as mais prevalentes na LG suína, sendo MAH a subespécie mais diagnosticada nos últimos anos em suínos e em humanos (MIJS *et al.*, 2002; AGDESTEIN *et al.*, 2011; AGDESTEIN *et al.*, 2012).

As micobactérias oportunistas mais comuns em aidéticos pertencem ao MAC (CAMPBELL, 2008). Nas últimas décadas, inúmeros estudos demonstraram relação genética próxima entre cepas de MAH de amostras de suínos e humanos, sugerindo que possam ser origem de transmissão entre si, ou que compartilhem de uma mesma fonte de contaminação (KOMIJN *et al.*, 1999; MOBIUS *et al.*, 2006; TIRKKONEN *et al.*, 2007; TIRKKONEN *et al.*, 2010). Devido à característica ubíqua do MAC, as fontes de contaminação são diversas, incluindo maravalha, água, solo, poeira, assim como os próprios

suínos (FALKINHAM,2009;KRIZOVA *et al.*, 2010). Até o momento, as subespécies do MAC não são consideradas patógenos transmitidos por alimentos, porém estudos recentes já apontam a possibilidade de alimentos de origem animal ser veículo de transmissão para humanos (KLANICOVA *et al.*, 2011; POLAČEK; ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, 2016). Apesar dos recentes dados, a Organização Mundial da Saúde estima apenas a mortalidade por via alimentar causada pelo *M. bovis*, que é responsável por aproximadamente 10.500 mortes anuais (WHO, 2015), apresentando potencial zoonótico relevante.

O exame macroscópico realizado durante o abate e o exame histopatológico são insuficientes para a definição dos patógenos envolvidos na LG, sejam eles micobactérias ou outras bactérias menos comuns, como *Rhodococcus equi*(MORÉS *et al.*, 2007; LARA *et al.*, 2011).A técnica histoquímica de Ziehl-Neelsen (ZN)é utilizada na rotina para detecção de micobactérias,detectando bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR); contudo a sensibilidade da técnica é variável (SHITAYE *et al.*, 2006). O padrão ouro de diagnóstico é o isolamento de micobactérias, associado a técnicas moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para distinção entre as espécies e subespécies de micobactérias envolvidas. Contudo, o isolamento é extremamente laborioso, pouco sensível e lento, estendendo-sepor no mínimo três semanas (TIRKKONEN, 2017), inviabilizando uma ação rápida dos órgãosde fiscalização no destino da carcaça e no controle da infecção nas granjas de origem. A Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica histoquímica simples e rápida, que se baseia no anelamento de uma sonda à sequência alvo. A técnicajá foi descrita para diversos microrganismos, dentre eles alguns de relevância em sanidade suína, como *Lawsoniaintracellularis*(BOUTRUP *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2010),*Actinobacilluspleuropneumoniae*(JENSEN *et al.*, 1999), *Pasteurellamultocida*(PORS *et al.*, 2011), bactérias do gênero *Brachyspira*(BOYE *et al.*, 1998), *Mycoplasmahyopneumoniae*e *Mycoplasmahyorhinis* (PEREIRA *et al.*, 2017).A FISH já foi descrita para detecção de micobactérias em tecidos parafinizados de humanos, bovinos, camundongos e porquinhos-da-índia (St. AMANDE *et al.*, 2005a; St. AMANDE *et al.*, 2005b;LEFMANN *et al.*, 2006;PORS *et al.*, 2011;RODRIGUEZ-NUÑES *et al.*, 2011).

Com base na permanência das micobactérias na priorização de risco e a frequência de ocorrência registrada pelo SIF, além do crescente interesse sobre a relação das micobactérias na produção animal e saúde humana, este trabalho teve como objetivo pesquisar a etiologia e as lesões histopatológicas das lesões granulomatosasdetectadas na linha de abate de

suínos para atualização dos dados nacionais e retro alimentar análises de risco. Além disso, visou padronizar a técnica de FISH em linfonodos parafinizados de suínos com LG, com o objetivo de obter um método diagnóstico mais sensível, simples e rápido para detecção de micobactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

No ano de 2017, foram coletadas amostras de linfonodos com lesões de LG, de 637 suínos abatidos, terminados e reprodutores (machos e fêmeas). Os animais eram provenientes de 399 granjas, localizadas em 158 municípios, de oito estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. Para a escolha dos frigoríficos considerou-se a frequência registrada pelo SIF (COLDEBELLA *et al.*, 2017), e disponibilidade do mesmo em realizar as coletas, totalizando 17 estabelecimentos, localizados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. As coletas foram realizadas por médicos veterinários treinados, priorizando a coleta de linfonodos mesentéricos. Caso houvesse lesão em linfonodos cefálico ou mediastinais, estes também eram coletados. As amostras foram armazenadas em formol a 10% para exame histopatológico de rotina, imuno-histoquímica (IHQ) e FISH, e acondicionados sob refrigeração para isolamento de micobactérias.

MATERIAL PARA EXAME HISTOLÓGICO

Os linfonodos após fixação foram clivados, processados e corados rotineiramente com hematoxilina e eosina (LUNA, 1968). As lesões granulomatosas foram classificadas em três graduações conforme HIBIYA *et al.* (2008), porém com algumas modificações. Resumidamente, a fase 1 (Fig. 1A) é a formação inicial do granuloma, caracterizada por ser uma reação exsudativa com células epitelioides, não encapsulada. Necrose extensa e mineralização não são observadas nesta fase. A fase 2 (Fig. 1B) é composta pela formação de granulomas clássicos, ou seja, visualiza-se área central de necrose, circundada por células epitelioides, linfócitos, macrófagos e na periferia cápsula de tecido conjuntivo

fibrosoevidente. A mineralização pode ou não estar presente. A fase 3 (Fig. 1C) são os granulomas mistos, onde há uma combinação entre fase 1 e fase 2, portanto o encapsulamento da lesão não é tão evidente, apesar da presença de proliferação de tecido conjuntivo fibroso na periferia. Nesta fase observa-se de moderada a acentuada proliferação de linfócitos, macrófagos e células epitelioides. A mineralização pode ou não estar presente. Nas amostras com granulomas em diferentes fases, considerou-se o padrão predominante. Os linfonodos que microscopicamente não apresentavam lesões granulomatosas, foram ainda agrupados em: outro tipo de lesão, linfonodos sem lesões microscópicas ou formações císticas.

Todas as amostras foram submetidas à técnica histoquímica ZN(Luna, 1968) para detectar BAAR graduadas conforme a quantidade de BAAR por campo de maior aumento (400x). Grau I: 01 – 10 BAAR, grau II: 11 – 20 BAAR, grau III (Fig. 1D): acima de 21 BAAR. Devido à baixa quantidade de bacilos, e sua distribuição multifocal e irregular no tecido, todo o corte histológico foi analisado, sendo levado em conta o campo com maior quantidade de BAAR. Para a técnica de ZN, a preparação das lâminas diferenciou-se da coloração de rotina, os tecidos foram cortados em seções de 3-4 µm, intercalando o corte de blocos com tecido, com blocos apenas de parafina, para evitar a contaminação de BAAR entre as amostras durante a obtenção da lâmina histológica.

IMUNO-HISTOQUÍMICA

As amostras graduadas como fase 1, em sua grande maioria, formam pequenos agregados de macrófagos e linfócitos, e por não apresentarem mineralização evidente e necrose extensa, foram submetidas à avaliação imuno-histoquímica para *Circovírus suíno tipo 2 (PCV2)*, enfermidade esta, que deve ser considerada dentre os diagnósticos diferenciais. As lâminas foram desparafinizadas em Xilol 100%, reidratadas em bateria de álcool decrescente, e utilizou-se anticorpo monoclonal (9H7) contra a proteína codificada pela ORF2 (capsídeo) do PCV2 (gentilmente cedido por Fernando Osório, Universidade de Nebraska, Estados Unidos), na diluição de 1:2000 (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2006).

ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS

Para a realização do isolamento de micobactérias, os linfonodos dos animais que eram provenientes da mesma granja, foram processados como *pool*, totalizando uma amostragem final de 399 origens. O isolamento e identificação foram realizados conforme OIE (2018), em instalação de biossegurança nível-3 (NB3), situado no Laboratório de Sanidade da EMBRAPA-Suínos e Aves. As amostras foram semeadas em meios Lowenstein-Jensen e Stonebrink, e incubados em estufa bacteriológica por aproximadamente 60 dias, a uma temperatura de 37°C. Os meios de cultura semeados foram avaliados quanto à presença de colônias semanalmente.

IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

As amostras que apresentaram colônias típicas de *Mycobacterium* spp., foram submetidas à técnica de ZN. Após confirmação da presença de BAAR no esfregaço do cultivo, foi realizada a extração do DNA da colônia e as amostras foram identificadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As sequências dos *primers* e as condições de amplificação estão descritos na Tabela 1. A amplificação do gene alvo *dnaJ* detecta 19 espécies de micobactérias (TAKEMAKI *et al.*, 1993), enquanto a amplificação de *IS1245* e *IS901* faz diferencial entre as subespécies *MAA/MASe MAH*. Para distinção entre as subespécies *M. tuberculosis* e *M. bovis* utilizou-se os *primers* desenhados para amplificação das regiões *INS* e *RD4*, respectivamente. Como controles foram utilizadas amostras de *MAH*, *MAA*, *Mycobacterium intracellulare*, *M. bovis* cepa AN5, *M. tuberculosis* cepa H37Rv e *Mycobacterium avium* (*M. avium*) D4.

HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

De acordo com o conhecimento dos autores, até então a técnica de FISH para *Mycobacterium* spp em tecido fixado de suínos não havia sido descrita. Desta maneira, a padronização da técnica foi executada de acordo com diversos autores, St. AMANDE *et al.* (2005a), LEFMANN *et al.* (2006), PORS *et al.* (2011); RODRIGUEZ-NUÑES *et al.* (2011). As sondas foram obtidas da Sigma-Aldrich, Brasil, e testadas individualmente.

Foramelas: MAV515lsu (5'-TGT CCA TGC ATG CGG TTT- 3') e MAC2534lsu (5' -ACG CCA CTA CACCCC AAA- 3'), ambas as sondas com alvo no segmento 23S do rRNA; MTB770 (5' - CACTATTCACACGCGCGT - 3'), MTB187 (5' - TGCATCCCGTGGTCCTATCC - 3'), MTB226 (5' - CCACACCGCTAAAG - 3') e EUB338 (5' - CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3'), estas com alvo do segmento 16S do rRNA. A sonda EUB338 detecta uma ampla quantidade de bactérias, por isso é utilizada em todos os testes para controle da efetividade de permeabilização nos diferentes protocolos utilizados (St. AMAN *et al.*, 2005a). Em uma primeira etapa, com o objetivo de verificar a viabilidade das sondas (MAV515lsu e MAC2534lsu), a técnica foi executada conforme PORS *et al.* (2011) em esfregaços obtidos a partir das colônias de amostras positivas na técnica da PCR para *M. avium*. Após obter resultados positivos na FISH do esfregaço, as sondas foram testadas em linfonodos mesentéricos parafinizados de suínos com lesão de LG e que obtiveram PCR positivo no cultivo para *M. avium*. Foram utilizados como controles negativos linfonodos mesentéricos de suínos sem alterações macroscópicas e histopatológicas, sem detecção de BAAR e que não apresentaram isolamento de micobactérias.

Todas as etapas de execução da FISH foram realizadas sem incidência de luz direta, e as lâminas foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Observer V1- Zeiss) com filtro para fluorocromo CY3 e objetivas com aumento de 40x e 100x.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE INC, 2002-2012). Foram construídas tabelas de frequência e avaliadas as associações entre variáveis de interesse pelo teste Exato de Fisher. As associações foram consideradas significativas sempre que o nível descritivo de probabilidade do teste foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Dos 637 linfonodos coletados pelo SIF, 613 eram mesentéricos, 20 da região da cabeça/papada e quatro linfonodos traqueobrônquicos. Do total, 542 amostras (85,1%) apresentaram lesão de LG no histopatológico. As lesões granulomatosas foram graduadas em três fases, e seus componentes histológicos podem ser verificados na Tabela 2, sendo a fase 0 considerada como as amostras com outro tipo de lesão, linfonodos sem lesões microscópicas e formações císticas. A fase 3 foi representada em sua grande maioria por lesões extensas que por vezes se coalesciam. Entre as fases 2 (granulomas clássicos) e 3 (granulomas mistos), 206 (38%) linfonodos apresentaram associação entre lesões, ou seja, mais de um tipo de fase por amostra.

Entre as categorias de animais(Tabela 3),71,7% (114/159) dos linfonodos de reprodutores apresentaram lesão histopatológica em fase 2; 18,87% (30/159) em fase 3 e apenas uma amostra em fase 1 (0,63%). A fase 2 e 3 em linfonodos de animais terminados apresentaram prevalência semelhante, 41,38% (199/478) e 40,38% (193/478) respectivamente, enquanto apenas 1,05% (5/478) amostras apresentaram lesão histopatológica em fase 1.

Com relação à técnica de ZN realizada em amostra de tecido e a fase da lesão(Tabela 4), apenas um linfonodo de seis, com lesão em fase 1 foi BAAR positivo, sendo classificado como grau I. Entre os linfonodos com lesão em fase 2,55,8%(173/310) das amostras foram positivas para BAAR, com predomínio de grau I (107/173), seguido de 22,5% (39/173) grau II e 15,6% (27/173) grau III. Três amostras do grupo de linfonodos com lesões em fase 2 foram perdidas, não tendo resultado de detecção de BAAR. Dos granulomas mistos (fase 3), 73,5%(164/223) foram positivos para BAAR, com predomínio de grau I (45,7%) (75/164), seguido de 28,7% (47/164) grau II e 25,6%(42/164) das amostras grau III.

Não foram observados bacilos em tecido saudável, mesmo nas áreas adjacentes a formação de granuloma, e a presença de BAAR se deu em meio à necrose e na periferia da mineralização, quando esta estava presente. Logo, verifica-se na Tabela 5 que em amostras com necrose, mineralização e fibrose nos granulomas, o número de BAAR é significativamente maior do que em amostras que não apresentam estas lesões. Já a presença

ou ausência de células gigantes não apresenta diferença significativa quanto à ocorrência de BAAR. Quando comparadas as categorias de animal, os suínos terminados apresentaram mais resultados BAAR positivos no tecido do que os reprodutores (Tabela 6).

As lesões caracterizadas como císticas, foram um achado casual, estando presentes em 6,1% (33/542) das lesões granulomatosas, e em 6,9% (44/637) apareceram como como lesão única nos linfonodos. Macroscopicamente visualizaram-se lesões císticas (Fig. 2A), variando de 0,3 cm a 1,3 cm de diâmetro, distribuídas de maneira focal a multifocal. As lesões apresentavam-se como cavitações de diferentes tamanhos no parênquima, sem conteúdo no seu interior ou eram preenchidas por dois diferentes tipos de materiais, que por vezes protruíam ao corte. Um deles translúcido e gelatinoso (Fig. 2B), enquanto o outro era brancacento e friável (Fig. 2C-D). Microscopicamente as áreas císticas são revestidas por um fino endotélio pavimentoso, preenchidas por discreto a acentuado infiltrado inflamatório linfocítico e histiocitário (Fig. 3A), apresentando áreas de necrose individual, e podendo ou não estar associado a material eosinofílico, amorfo e homogêneo (Foto 3B-3C). Algumas amostras não apresentaram conteúdo em seu interior (3D), ou em raros casos, necrose extensa associada a restos celulares.

Não houve presença de BAAR nas áreas isentas de lesão, assim como no interior das lesões císticas (Tabela 4), mesmo nas amostras com presença de lesões granulomatosas, e com presença de BAAR no interior dos granulomas.

As duas amostras classificadas como outro tipo de lesão (Tabela 4) tinham as seguintes alterações: uma com substituição do tecido linfoide por proliferação acentuada de tecido conjuntivo fibroso, sendo essa amostra negativa para IHQ de PCV2; e a outra com linfadenite piogranulomatosa acentuada e difusa, sem crescimento nos meios para isolamento de micobactérias.

IMUNO-HISTOQUÍMICA

Todas as amostras graduadas como fase 1, foram negativas na imuno-histoquímica para PCV2.

ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS

A frequência de isolamento de micobactérias foi de 32,08% (128/399), destas 76,56% (98/128) origens foram positivas para *MAH*, 1,56% (2/128) origens positivas para *M. bovis* e 21,87% (28/128) origens positivas apenas para o gênero *Mycobacterium* spp., não pertencendo às espécies investigadas. Dez origens apresentaram crescimento nos meios utilizados para isolamento de micobactérias, porém foram PCR negativas para *Mycobacterium* spp. Do total, 261 origens (65,41%) não apresentaram crescimento nos meios de cultivo. A interpretação da tipificação dos isolados por PCR está demonstrada na Tabela 7.

A distribuição das micobactérias identificadas de acordo com o estado de origem da amostra está demonstrada na Tabela 8, e a distribuição espacial por município na Figura 4. As duas origens positivas para *M. bovis* foram coletadas no mesmo matadouro-frigorífico, porém pertenciam a granjas localizadas em municípios distintos. Uma das amostras positivas era de linfonodo traqueobrônquico e a outra de linfonodo mesentérico. Todas as origens dos estados do Mato Grosso do Sul e do Mato Grosso, foram negativas no isolamento e identificação de micobactérias, porém o número de granjas quando comparado aos demais estados foi baixo, 0,75% (3/398) e 1,0% (4/398), respectivamente. Na Tabela 9 observa-se que houve associação significativa ($p < 0,0001$), pelo teste Exato de Fisher, entre os resultados de isolamento microbiológico e a categoria de animal, sendo que os suínos terminados apresentaram 46,69% (120/257) das origens positivas para micobactérias e reprodutores apenas 5,63% (8/142).

Para testar a associação entre resultados histopatológicos e de identificação de micobactérias, foram utilizadas apenas as amostras processadas individualmente no isolamento de micobactérias, totalizando 310 amostras. Ao correlacionar os resultados da técnica de ZN no tecido com os da identificação das micobactérias por PCR, o total de amostras foi de 307, três amostras do ZN no tecido foram perdidas. Quando foi relacionado o resultado da identificação de micobactérias com a presença de BAAR no tecido (Tabela 10), observou-se que em 71,7% das amostras positivas para *MAH* e 75% das amostras positivas para *Mycobacterium* spp., houve detecção de BAAR no tecido, enquanto que apenas uma (1/3) amostra positiva para *M. bovis* foi BAAR positiva. Ao associar a classificação de lesões no exame histopatológico com a identificação das micobactérias (Tabela 11), observou-se que os granulomas mistos (fase 3) apresentaram maior frequência de amostras positivas para micobactérias em comparação com os granulomas clássicos (fase 2). Cinco amostras que não

apresentaram nenhum tipo de lesão histopatológica e uma amostra com lesão apenas cística foram positivas para *MAH*. Isto se justifica, pois estas amostras enviadas para isolamento de micobactérias, ao contrário das amostras enviadas para a patologia, possuíam lesão granulomatosa macroscópica.

HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

Não houve marcação fluorescente compatível com micobactérias em nenhuma das sondas utilizadas. Contudo, observou-se intensa fluorescência inespecífica, nas áreas de mineralização e no interior do citoplasma de alguns macrófagos, estes localizados principalmente, circundando a lesão.

DISCUSSÃO

Do total de linfonodos coletados pelo SIF por apresentarem lesões macroscópicas de linfadenite, em 85,1% foram confirmadas lesões histopatológicas compatíveis com LG. Demonstrando valor preditivo positivo alto da avaliação macroscópica realizada na linha de inspeção. Esses resultados são próximos aos estudos realizados anteriormente por Ferreira Neto *et al.* (1989) e Morés *et al.* (2007), que demonstraram garantia de 100% e 90,3%, respectivamente, entre exame macroscópico e histopatológico.

A principal rota de infecção das micobactérias em suínosé via fecal-oral (MORÉS *et al.*, 2007, AGDESTEIN *et al.*, 2012). Uma vez no lúmen intestinal não está clara a patogênese da infecção, contudo sabe-se que o MAC é capaz de invadir a parede intestinal ao se ligar a enterócitos e provavelmente a células M (MAPOTHER; SANGER, 1984; INDERLIED; KEMPER; BERMUDES, 1993; SANGARI *et al.*, 2001; STROMEVORA; FALDYNA, 2018). A invasão das micobactérias para o interior dos macrófagos ocorre após a transposição das barreiras físicas intestinais (STROMEVORA; FALDYNA, 2018) e é mediada por diferentes mecanismos, como a ligação a opsoninas: CR3 e a fibronectina (BERMUDEZ *et al.*, 1991). Apesar da capacidade das micobactérias em sobreviver no interior dos macrófagos (BERMUDEZ *et al.*, 2000; FERRAZ *et al.*, 2006), a disseminação do patógeno para os linfonodos periféricos, ocorre através das células dendríticas que se deslocam até estes

sítios para a apresentação de antígenos (WOLF *et al.*, 2007), sendo que a participação dos macrófagos nesse transporte não está esclarecida (ORME; BASARABA, 2014).

A diversidade nas características das lesões histopatológicas de LG em suínos já é descrita na literatura (HIBIYA *et al.*, 2008; ANDREAZZA *et al.*, 2015), e também foi demonstrada no presente estudo. Acland & Whitlock (1986) demonstraram em suínos inoculados via oral com *M. avium*, a progressão de lesões granulomatosas, iniciando com agregados de células epitelioides e evoluindo para granulomas mineralizados e bem encapsulados. Sabe-se que lesões macroscópicas são verificadas após dois meses da inoculação, assim como a formação de granulomas encapsulados ocorrem a partir da 18ª semana pós-inoculação (ACLAND; WHITLOCK, 1986). A definição da época em que ocorreu o contato com o patógeno é complexa em animais naturalmente infectados (HIBIYA *et al.*, 2008), porém levando em conta o tempo necessário para o desenvolvimento das lesões e a idade de abate dos animais, supõe-se que a infecção deva ocorrer nas primeiras fases da criação: maternidade, creche e início de terminação. Neste estudo a associação entre diferentes fases de lesões foi recorrente e apesar da fase 1 ser considerada a lesão inicial, não está bem claro se a fase 3 é a progressão da fase 2, ou vice-versa.

A categoria animal de reprodutores apresentou predomínio de lesões em fase 2 (granulomas clássicos), enquanto suínos terminados apresentaram frequências semelhantes de lesões em fase 2 (granulomas clássicos) e fase 3 (granulomas mistos). Em ambos os casos a quantidade de amostras com lesão em fase 1 foi menor. Associado a estes resultados, a porcentagem de amostras de reprodutores em que houve detecção de BAAR no tecido e/ou foram positivos no isolamento de micobactérias, foi inferior ao encontrado em terminados. A formação do granuloma é um mecanismo do hospedeiro para “aprisionar” o patógeno e conter a infecção (ORME; BASARABA, 2014) e a principal forma de apresentação da LG em suínos é subclínica, com escassos relatos de cepas MAC mais virulentas, causando desordens reprodutivas (ELLSWORTH *et al.*, 1979; WELLENBERG *et al.*, 2010; EISENBERG *et al.*, 2012). Desta forma, é sugerido que animais mais velhos por apresentarem lesões granulomatosas organizadas (granulomas clássicos) e menor quantidade de amostras BAAR positivas e isolamento de micobactérias, conseguem consequentemente conter o patógeno. Uma próxima etapa seria caracterizada pela degeneração do granuloma e posterior resolução da lesão (MORÉS; OLIVEIRA, 2007; ORME; BASARABA, 2014).

O infiltrado composto por eosinófilos foi observado em todas as fases, assim como relatados por outros autores (HIBIYA *et al.*, 2008, ANDREAZZA *et al.*, 2015). A interpretação desse infiltrado deve levar em consideração que em suínos este tipo celular é mais frequentemente observado. Células gigantes são mais observadas em granulomas imaturos (ACLAND; WHITLOCK, 1986; HIBIYA *et al.*, 2008), porém devido ao baixo número de amostras em fase 1, que caracteriza o início do granuloma, é difícil afirmar que o mesmo ocorreu neste estudo.

No tecido corado pela técnica de ZN, houve a detecção de BAAR na grande maioria das amostras em que houve isolamento de MNT, porém em apenas uma (1/3) das amostras com isolamento de *M. bovis*, demonstrando que resultados negativos no ZN, não descartam a LG causada pelo gênero *Mycobacterium*. Resultados semelhantes foram relatados em estudo conduzido na República Checa, no qual micobactérias foram isoladas a partir de 16% das amostras (289/1852) que foram ZN negativas (SHITAYE *et al.*, 2006). Na medicina humana há, também, relatos de cultivo positivo de *M. tuberculosis* em amostras que apresentavam esfregaço de escarro ZN negativo (RASOOL *et al.*, 2019). Apesar da diferença na detecção de BAAR entre amostras CMtbe MNT descritas na literatura (ANDREAZZA *et al.*, 2015; CASWELL; WILLIAMS, 2016), a técnica de ZN por si só, não é capaz de definir entre as espécies de micobactérias envolvidas (POLAČEK; ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, 2016).

Das amostras de tecido positivas para BAAR, em 60,47% não houve isolamento ou foram negativas na PCR para *Mycobacterium spp.* Esse resultado pode ser justificado pela etapa de descontaminação das amostras que antecede o isolamento bacteriológico e utiliza hidróxido de sódio (NaOH), que é tóxico para algumas micobactérias contribuindo para a diminuição de bactérias viáveis para posterior crescimento e multiplicação nos meios de cultivo (BRASIL, 2010). Além disso, neste estudo as amostras para cultivo e isolamento foram enviadas e processadas separadamente das amostras enviadas ao setor de patologia, logo, a quantidade de material assim como a presença, ausência ou tamanho da lesão variaram para ambas as técnicas. A coloração de ZN, por sua vez, não é específica apenas para micobactérias, podendo ser positiva para outras bactérias álcool-ácido resistentes, como por exemplo, *Rhodococcus equi* (SPILIOPOULOU *et al.*, 2014; POLAČEK; ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, 2016).

Estudo realizado anteriormente (ANDREAZZA *et al.*, 2015) encontrou abundante quantidade de BAAR livres em áreas de necrose, sendo este achado semelhante ao encontrado

neste estudo. Além da necrose, a presença de componentes como mineralização e fibrose também favoreceram a detecção de BAAR(Tabela 5).

As lesões císticas encontradas nos linfonodos são compatíveis com achados observados em camundongos idosos. Essas lesões são caracterizadas por seios dilatados ou císticos no parênquima linfoide, e denominadas de linfangiectasia ou ectasia de seio linfático. São descritas como áreas císticas revestidas por endotélio linfático, por vezes, preenchida por material eosinofílico/anofílico amorfo, podendo ou não conter linfócitos, macrófagos e células plasmáticas associadas. A linfangiectasia nestes animais é encontrada principalmente em linfonodos mesentéricos e mediastinais (ELMORE, 2006). Em suínos, lesões císticas foram encontradas em animais inoculados com *MAA* como lesão única (8/10) ou em associação com lesão granulomatosa (2/10), porém sem descrição histopatológica e definição de origem (AGDESTEIN *et al.*, 2012). Neste mesmo experimento o conteúdo no interior dos cistos demonstrou ser estéril no exame bacteriológico, exame este não realizado neste estudo. De qualquer forma não foram detectados BAAR no interior de nenhuma dilatação, assim como nenhuma das amostras que apresentaram lesões apenas císticas na macroscopia e histopatologia, foi identificado *Mycobacterium* spp. na PCR. Não foi possível atribuir a causa dos cistos, nem sua correlação com as micobactérias, porém a semelhança dos achados microscópicos com os da literatura (ELMORE, 2006) sugere que sejam áreas de linfangiectasia.

Neste estudo, *MAH* foi à subespécie mais diagnosticada como agente etiológico das LG, confirmando esta subespécie como a mais prevalente na população suína (MIJS *et al.*, 2002; JOHANSEN *et al.*, 2007; DOMINGOS; AMADO; BOTELHO, 2009; AGDESTEIN *et al.*, 2012). Detecção de *MAH* em fezes de suínos já foi relatada em animais de experimentação assim como naturalmente infectados (AGDESTEIN *et al.*, 2012, AGDESTEIN *et al.*, 2014), fortalecendo a hipótese da transmissão fecal-oral entre animais e tornando esta forma de transmissão importante para justificar a permanência e a prevalência da subespécie nas granjas suínas. Além do que, entre as subespécies de *M. avium*, o *MAH* apresenta maior habilidade de se replicar no meio ambiente e desta forma, é considerada a verdadeira subespécie ambiental do *M. avium* (TURENNE; WALLACE; BEHR, 2007; AGDESTEIN *et al.*, 2012). Neste estudo não foram detectados isolados positivos para *MAA*, demonstrando que a epidemiologia da doença ainda é pouco conhecida, uma vez que, apesar do desenvolvimento da suinocultura nos últimos anos, é frequente o contato dos suínos com

aves e excretas de aves, consideradas importantes reservatórios do agente (DHAMA *et al.*, 2011).

Estudo realizado em Portugal demonstrou diferentes cepas de *MAH* na mesma granja, sugerindo que haveria mais de uma fonte de infecção nestas produções (DOMINGOS; AMADO; BOTELHO, 2009). Na Dinamarca, em um surto de ordem reprodutiva, *MAH* foi encontrada na água, porém sem dados relevantes para considerar esta a fonte responsável pela infecção dos animais (EISENBERG *et al.*, 2012). Este estudo não pesquisou origem da contaminação nas granjas positivas para *MAH*.

Dentre os agentes envolvidos na tuberculose, o *M. bovis* é o patógeno responsável pela tuberculose zoonótica (CARDOSO, 2009). Na análise qualitativa de risco este agente foi considerado de baixo risco, devido à baixa frequência de ocorrência (COSTA *et al.*, 2017). Essa classificação foi corroborada pelos achados deste estudo, onde apenas em duas origens (1,56%) houve isolamento de *M. bovis*. Criações ao ar livre, má qualidade de biossegurança (BAYLE *et al.*, 2013), alimentação à base de resíduos alimentares, ou subprodutos de bovinos, como soro de leite são fatores que aumentam a vulnerabilidade dos suínos ao patógeno (SCHWARZ *et al.*, 2002; MORÉS *et al.*, 2007; CARDOSO, 2009). Neste estudo, as granjas positivas para *M. bovis* apresentam criação concomitante de bovinos de leite, porém não foram registradas evidências da fonte de infecção, assim como não havia registro de tuberculose em bovinos dessas propriedades. BAYLE *et al.* (2013) encontraram as mesmas cepas de *M. bovis* em suínos e bovinos, apesar do contato entre essas duas espécies ser pouco observado. Apesar da não identificação da origem da infecção nas granjas deste estudo, sugere-se que o contato próximo com bovinos seja a fonte provável para a contaminação dos suínos.

As origens positivas apenas para o gênero *Mycobacterium* spp. podem incluir as subespécies menos comuns de micobactérias não-tuberculosas (MNT) e que vêm sendo identificadas em linfonodos e fezes de suínos (AGDESTAIN *et al.*, 2014). Uma vez que não avaliamos as subespécies de MNT atípicas envolvidas na amostragem, futuros estudos devem abordar esse tema, dado que esse grupo representou 21,87% (28/128) do total dos isolados.

Resultados negativos na FISH podem ser justificados por algumas mudanças nas características e no metabolismo das micobactérias quando no interior dos granulomas. A área central de necrose cria um ambiente hipóxico e com falta de nutrientes, sugerindo diminuição do metabolismo da bactéria e, conseqüentemente, diminuição da quantidade de RNA

ribossomal (RNA) a um limite abaixo do detectado pela técnica. Sugere-se ainda que o ambiente hipóxico estimule o aumento da espessura da parede celular, dificultado a penetração da sonda na célula (RYAN *et al.*, 2010; SAKAMOTO, 2012). A mineralização presente nas amostras deste estudo, também foi fator negativo para leitura da técnica, devido à acentuada deposição inespecífica de fluorescência nesse material (BOREKCI; LEE, 2016).

Para que ocorra a diminuição da frequência de LG nos frigoríficos medidas a campo devem ser tomadas. Apenas a eliminação dos reprodutores não é suficiente no controle da doença, uma vez que é necessário conhecer a fonte de contaminação, além de minimizar os fatores que favorecem a manutenção do agente no rebanho. A limpeza e desinfecção das baias, além da utilização de desinfetantes, como produtos a base de fenol, hipoclorito de sódio (MCDONNELL; RUSSEL *et al.*, 1999; HERNÁNDEZ *et al.*, 2003) e ácido peracético (MORATO F., 2007) são práticas importantes na eliminação da contaminação residual entre lotes. Estudos realizados por outros autores (SILVA *et al.*, 2001; AMARAL *et al.*, 2004) demonstram que os fatores de risco associados à ocorrência das micobacterioses estão intimamente relacionados com limpeza, desinfecção e biossegurança das granjas. Dentre alguns fatores estão higiene dos comedouros, bebedouros, tratamento da água fornecida aos animais, piso ripado, controle do contato dos suínos com outros animais, vertebrados e pequenos mamíferos, os quais podem atuar como vetores (FISCHER *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001; FISCHER *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2004; FISCHER *et al.*, 2004a; FISCHER *et al.*, 2004b). O foco é atuar nas unidades produtivas para reduzir a ocorrência da doença de forma que seja considerada um risco negligenciável para saúde pública.

CONCLUSÃO

Este artigo demonstra a prevalência da subespécie *MAH* como principal agente envolvido na LG em suínos no Brasil. Limitações encontradas no diagnóstico de micobactérias foram demonstradas neste estudo, assim como não se obteve sucesso na padronização da técnica de FISH em tecido linfóide parafinado de suínos com linfadenite granulomatosa. Apesar da prevalência de micobactérias não-tuberculosas, e o diagnóstico de apenas duas origens positivas para *M. bovis*, estes resultados ficam a disposição para serem

utilizados em análises de risco, para subsidiar políticas públicas relacionadas a inspeção assim como programas de vigilância de tuberculose suína.

Tabela 1. *Primers* utilizados para identificação de micobactérias.

<i>Primers</i>	Sequência	Tamanho do fragmento	Referência
DNAJ	5'- GGG TGA CGC GAC ATG GCC CA -3' 3'- CGG GTT TCG TCG TAC TCC TT -5'	236pb	(TAKEWAKI et al., 1993)
IS1245	5'- GCC GCC GAA ACG ATC TAC- 3' 3'- AGG TGG CGT CGA GGA AGAC -5'	427pb	(GUERRERO et al., 1995)
IS901	M IS901F 5'- GGATTGCTAACCACGTGGTG -3' M IS901R 3'- GCGAGTAGCTTGATGAGCG -5'	577pb	(MORAVKOVA et al., 2008)
INS	INS15'- CGTGAGGGCATCGAGGTGGC - 3' INS2 3'- GCG TAGGCGTCGGTGACAAA -5'	245pb	(VAN EMBDEN et al., 1993)
RD4	5' AACGCGACGACCTCATATTC 3' 3' AAGGCGAACAGATTCAGCAT 5'	400pb	(SALES et al., 2014)

Tabela 2. Distribuição dos tipos de lesões encontradas em função da fase histopatológica.

Tipo de lesão	Fase				P*
	0**	1	2	3	
Número de amostras	95	6	313	223	
Necrose	2 (2,11) ^a	6 (100,00) ^b	313 (100,00) ^b	223 (100,00) ^b	<0,0001
Mineralização	2 (2,11) ^a	0 (0,00) ^a	307 (98,08) ^b	216 (96,86) ^b	<0,0001
Fibrose	1 (1,05) ^a	1 (16,67) ^a	311 (99,36) ^b	219 (98,21) ^b	<0,0001
Linfócitos	2 (2,11) ^a	6 (100,00) ^{bc}	261 (83,39) ^c	218 (97,76) ^b	<0,0001
Neutrófilos	1 (1,05) ^a	0 (0,00) ^{abc}	20 (6,39) ^b	30 (13,45) ^c	0,0006
Eosinófilos	1 (1,05) ^a	4 (66,67) ^{bc}	128 (40,89) ^b	156 (69,96) ^c	<0,0001
Células Gigantes	1 (1,05) ^a	2 (33,33) ^b	84 (26,84) ^b	103 (46,19) ^c	<0,0001

* Nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher;

** Sem lesões microscópicas, outro tipo de lesão e lesões císticas.

Valores seguidos por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 3. Distribuição do tipo de lesão histopatológica (fase) de acordo com a categoria animal.

Categoria animal	Fase histopatológica				Número de amostras	P*
	0	1	2	3		
Reprodutor	8.81	0.63	71.70	18.87	159	
Terminado	16.95	1.05	41.63	40.38	478	<0,0001
Total	95	6	313	223	637	

* Nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher.

Fonte: elaborado pela autora, 2019

Tabela 4. Número de amostras e porcentagens de animais positivos para Ziehl-Neelsen (ZN) em função do tipo de lesão histológica principal.

Tipo de lesão principal	Número de amostras	% amostras ZNpositivos
Fase 1 - Reação exsudativa com células epitelioides	6	16.67 ^{ab} (1/6)
Fase 2- Granuloma clássico	310	55.81 ^b (173/310)
Fase 3 - Granulomas misto	223	73.54 ^c (164/223)
Outro tipo de lesão	2	0.00 ^{ab}
Sem lesão microscópica	49	0.00 ^a
Lesões císticas	44	0.00 ^a
Nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher		<0,0001

^{ab}Porcentagens seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 5. Distribuição da quantificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) na coloração de tecidos por Ziehl-Neelsen (ZN) de acordo com a presença ou ausência de tipos de lesões histopatológicas.

Características das lesões	Classificação do Ziehl-Neelsen, %				Número de amostras	P*
	Negativo	I	II	III		
Necrose						<0,0001
Negativo	100.00	0.00	0.00	0.00	93	
Positivo	37.52	33.83	15.90	12.75	541	
Mineralização						<0,0001
Negativo	97.32	0.89	0.89	0.89	112	
Positivo	35.82	34.87	16.28	13.03	522	
Fibrose						<0,0001
Negativo	97.14	1.90	0.00	0.95	105	
Positivo	36.67	34.22	16.26	12.85	529	
Células Gigantes						0.3471
Negativo	48.99	27.64	13.03	10.34	445	
Positivo	41.27	31.75	14.81	12.17	189	

* Nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher.

Legenda - Grau I: 01 – 10 BAAR, grau II: 11 – 20 BAAR, grau III: acima de 21 BAAR.

Fonte: elaborado pela autora, 2019

Tabela 6. Distribuição da análise quantitativa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) pela técnica histoquímica de Ziehl-Neelsen (ZN) de acordo com a categoria animal.

Categoria animal	Ziehl-Neelsen, %				Número de amostras	P*
	Negativo	I	II	III		
Reprodutor	53.50	34.39	8.28	3.82	157	
Terminado	44.44	27.04	15.30	13.21	477	<0,0001
Total	46,69	28,86	13,56	10,88	634	

* Nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher.

Fonte: elaborado pela autora, 2019

Tabela 7. Resultado do isolamento e identificação de micobactérias por origem de amostras de linfonodos de suínos abatidos.

	<i>Primers</i>					Número de origens
	DNAJ	IS1245	IS901	INS	RD4	
<i>Mycobacterium</i> spp.	+	-	-	-	-	28
<i>MAA/MAS</i>	+	+	+	-	-	0
<i>MAH</i>	+	+	-	-	-	98
<i>M. bovis</i>	+	-	-	-	+	2
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	-	+	-	0
Negativo para <i>Mycobacterium</i> spp.	-	NR*	NR	NR	NR	10
Sem isolamento	NR	NR	NR	NR	NR	261
Total de amostras						399

*NR: não realizado.

Legenda – *MAA* = *Mycobacterium avium avium*, *MAS* = *Mycobacterium avium silvaticum*, *MAH* = *Mycobacterium avium hominissuis*, *M. bovis* = *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis* = *Mycobacterium tuberculosis*, (+) = positivo, (-) = negativo.

Fonte: elaborado pela autora, 2019

Tabela 8. Distribuição dos resultados de isolamento e identificação de micobactérias de acordo com a localização estadual da granja.

Estado de Origem	Micobactérias identificadas, %				Total de origens
	<i>MAH</i>	<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>M. bovis</i>	Negativo	
GO	01(10.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	09 (90.00)	10
MG	13(18.06)	11(15.28)	0(0.00)	48(66.67)	72
MS	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	03(100.00)	3
MT	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	4(100.00)	4
PR	17 (31.48)	06 (11.11)	0 (0.00)	31 (57.41)	54
RS	15 (28.30)	06 (11.32)	02 (3.77)	30 (56.60)	53
SC	42 (24.85)	05 (2.96)	0 (0.00)	122 (72.19)	169
SP	09 (27.27)	0 (0.00)	0 (0.00)	24 (72.73)	33

Legenda – *MAH* = *Mycobacterium avium hominissuis*, *M. bovis* = *Mycobacterium bovis*, GO = Goiás, MG = Minas Gerais, MS = Mato Grosso do Sul, MT= Mato Grosso, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, SC = Santa Catarina, SP = São Paulo.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 9. Distribuição de micobactérias em função da categoria animal.

Categoria animal	Micobactérias identificadas, %				Número de amostras	P*
	<i>MAH</i>	<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>M. bovis</i>	Negativo		
Reprodutores	4.93	0.70	0.00	94.37	142	
Terminado	35.41	10.51	0.78	53.31	257	<0.0001
Total	24.56	7.02	0.50	67.92	399	

* Nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher.

Legenda – *MAH* = *Mycobacterium avium hominissuis*, *M. bovis* = *Mycobacterium bovis*.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 10. Número de amostras e porcentagens de animais positivos para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) na técnica histoquímica de Ziehl-Neelsen (ZN), em função do resultado por animal do resultado da PCR das micobactérias isoladas. Porcentagens de isolamentos em amostras negativas e positivas para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) na técnica histoquímica de Ziehl-Neelsen (ZN).

Resultado PCR/ Isolamentomicoba ctérias	Estatística	Ziehl-Neelsen no tecido		Total	Nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher
		Negativo	Positivo		
<i>MAH</i> ^a	n	15	38	53	
	% da linha	28.30	71.70		
	% da coluna	8.43	29.46		
<i>Mycobacterium spp.</i> ^a	n	4	12	16	
	% da linha	25.00	75.00		
	% da coluna	2.25	9.30		
<i>M. bovis</i> ^{ab}	n	2	1	3	
	% da linha	66.67	33.33		
	% da coluna	1.12	0.78		
Negativo ^b	n	157	78	235	
	% da linha	66.81	33.19		
	% da coluna	88.20	60.47		
Total	n	178	129	307	<0,0001
	% da linha	57.98	42.02		

^{ab}Resultados microbiológicos seguidos por letras distintas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

Legenda – *MAH* = *Mycobacterium avium hominissuis*, *M. bovis* = *Mycobacterium bovis*, n = número de amostras.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 11. Micobactérias isoladas em função do tipo de lesão histológica principal.

Tipo de lesão principal	Micobactérias identificadas, %				Número de amostras	P*
	<i>MAH</i>	<i>Mycobacterium</i> spp	<i>M. bovis</i>	Negativo		
Fase 1 ^{ab}	33.33	0.00	0.00	66.67	3	
Fase 2 ^a	13.53	4.12	0.00	82.35	170	
Fase 3 ^b	27.91	10.47	3.49	58.14	86	
Outro tipo de lesão ^{ab}	0.00	0.00	0.00	100.00	2	
Sem lesão microscópica ^{ab}	19.23	0.00	0.00	80.77	26	
Lesão cística ^a	4.35	0.00	0.00	95.65	23	<0,0001

* Nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher.

Tipos de lesão principal seguidos por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

Legenda – *MAH* = *Mycobacterium avium hominissuis*, *M. bovis* = *Mycobacterium bovis*, Fase 1 = reação exsudativa com células epitelioides, Fase 2: granulomas clássicos, Fase 3: granulomas mistos.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

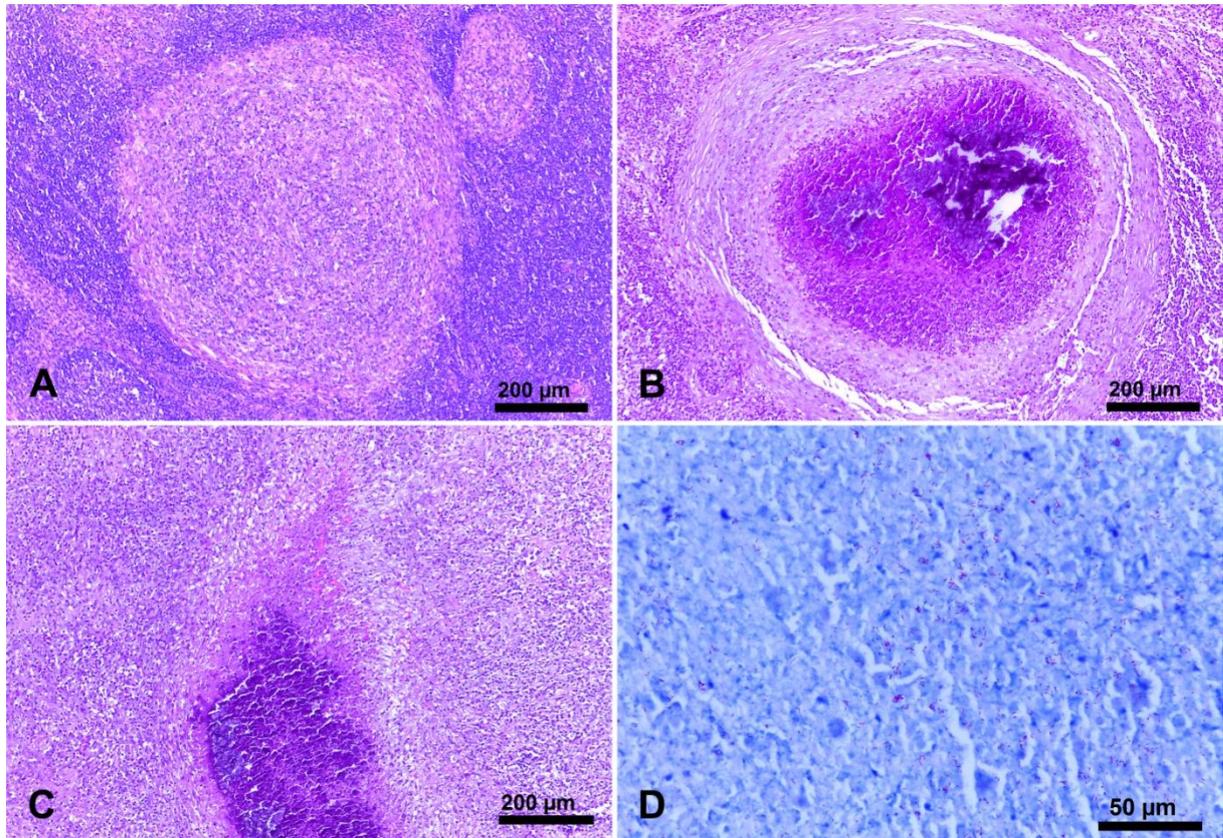


Fig. 1. Classificação histológica das lesões granulomatosas em linfonodos de suínos. (A) exemplos de granulomas em fase 1, caracterizados por reação granulomatosa, não encapsulada. Estes granulomas não apresentam área central de necrose, tampouco mineralização (linfonodo mesentérico, HE); (B) exemplo de granuloma em fase 2 ou granuloma clássico, caracterizado por área central de necrose e na periferia cápsula de tecido conjuntivo fibroso evidente. A mineralização é observada em meio à necrose caseosa (linfonodo mesentérico, HE); (C) exemplo de granuloma em fase 3 ou granuloma misto. Inflamação granulomatosa acentuada, com área central de necrose caseosa associada à mineralização focal moderada, além de proliferação multifocal discreta de fibroblastos em meio ao granuloma (linfonodo mesentérico, HE), (D) exemplo de classificação em grau III, bacilos álcool-ácido resistentes dispersos em meio à área de necrose caseosa, no interior de granuloma (linfonodo mesentérico, Ziehl-Neelsen).



Fig. 2. Lesões císticas em linfonodos mesentéricos de suínos. (A) Lesão cística de 0,7 cm de diâmetro (seta), (B) ao corte o conteúdo é gelatinoso e translúcido (seta), (C-D) lesão cística, contendo em seu interior material brancacento e friável (seta).

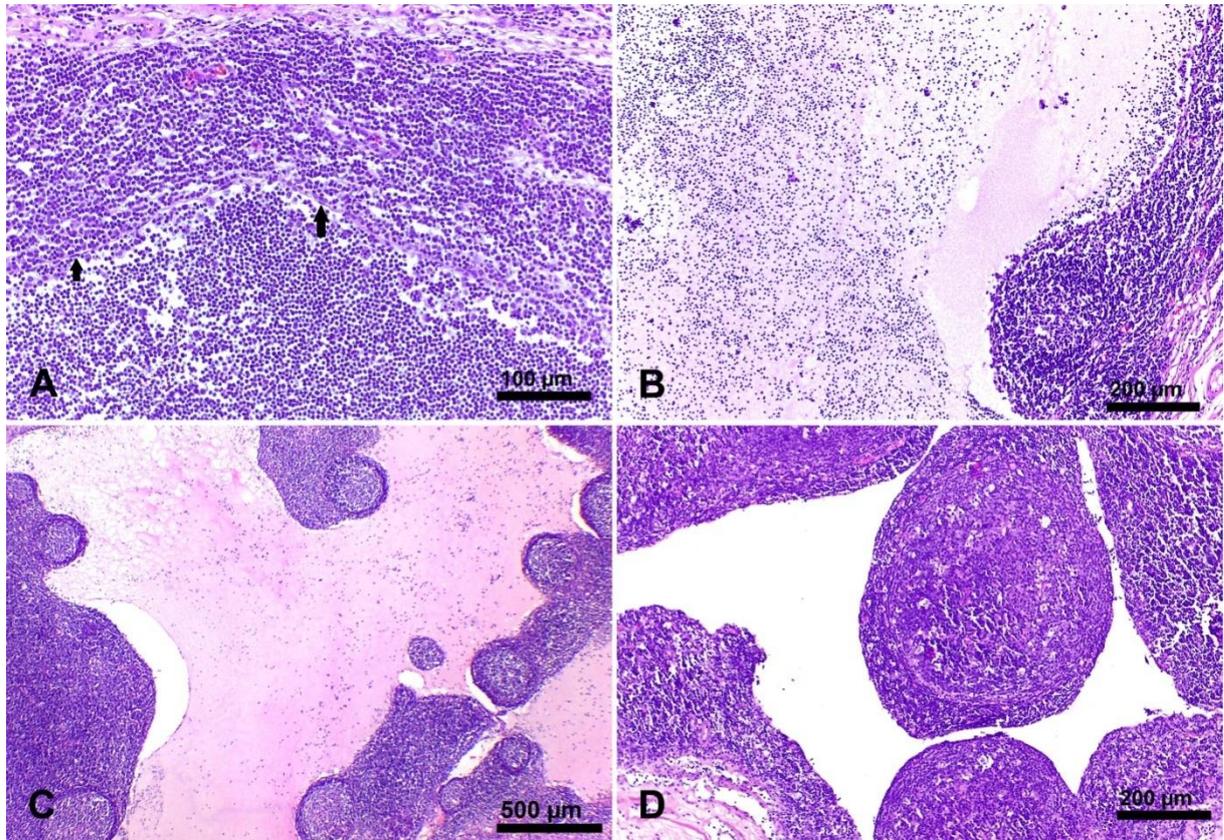
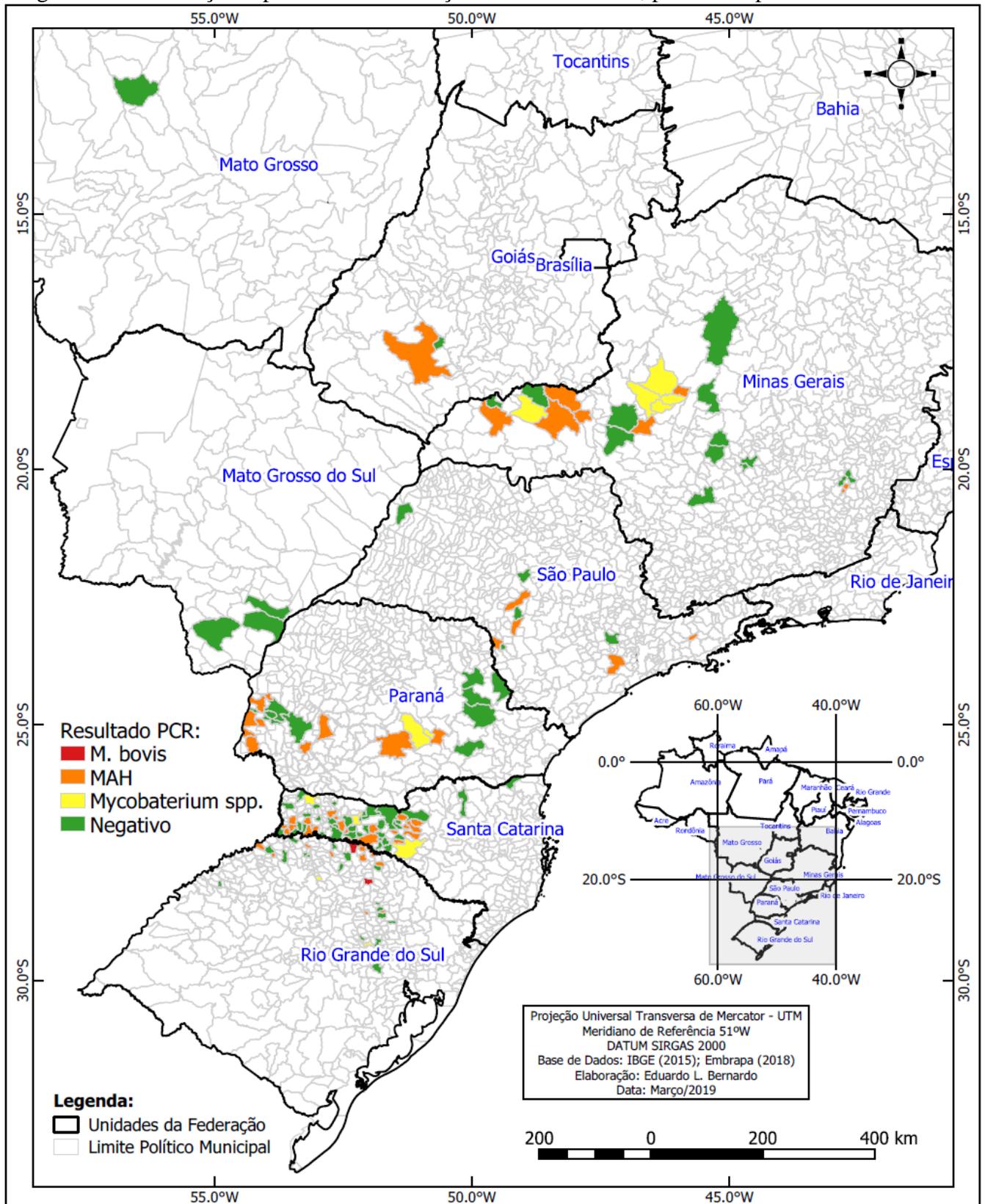


Fig. 3. Caracterização histológica das lesões consideradas macroscopicamente como lesões císticas, encontradas em linfonodos mesentéricos de suínos com suspeita de linfadenite granulomatosa. (A) Área cística revestida por um fino endotélio pavimentoso (seta), e preenchida por acentuada quantidade de linfócitos, e raros macrófagos (linfonodo mesentérico, HE); (B) área cística preenchida por moderado infiltrado inflamatório de linfócitos e em menor quantidade macrófagos, em meio à moderada quantidade de material eosinofílico amorfo. Observa-se ainda necrose individual de células inflamatórias (linfonodo mesentérico, HE); (C) extensa área cística preenchida por acentuada quantidade de material eosinofílico amorfo, associado à discreta quantidade de linfócitos e macrófagos (linfonodo mesentérico, HE) e (D) exemplo de área cística sem conteúdo no seu interior (linfonodo mesentérico, HE).

Figura 04. Distribuição espacial da identificação de micobactérias, por município.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclusões:

1. Dos linfonodos coletados nos frigoríficos 85,1% apresentarão lesão histopatológica compatível com LG, Demonstrando valor preditivo positivo alto quando comparado avaliação macroscópica realizada na linha de inspeção e o exame histopatológico.
2. O *Mycobacterium aviumhominissuis* é a principal subespécie de micobactérias envolvidas na linfadenite granulomatosa em suínos no Brasil.
3. A taxa de isolamento de micobactérias foi de 32,08% (128/399), destas 98 (76,56%) origens foram positivas para *Mycobacterium avium hominissuis* (MAH), duas (1,56%) origens positivas para *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), 28 (21,87%) origens positivas para o gênero *Mycobacterium* spp.
4. Bacilos-álcool ácido resistentes foram observados em 71,7% das amostras com identificação de MAH, em 75% das amostras com identificação de *Mycobacterium* spp.e em um terço das amostras com identificação de *M. bovis*.
5. Das amostras positivas para BAAR no tecido, 60,47% não tiveram isolamento ou foram negativas na identificação pela técnica da PCR para *Mycobacterium* spp.
6. Os protocolos testados para a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) em tecidos linfoides parafinizados de suínos foram negativos.
7. A continuidade da inspeção em busca de lesões de linfadenite granulomatosa suína deve ser aconselhada ao Serviço de Inspeção Federal Brasileiro.

Propostas de projetos futuros:

1. Desenvolver uma técnica diagnóstica para micobactérias mais simples, rápida e sensível; evitando o isolamento, e preferencialmente utilizando tecidos parafinizados.
2. Identificar quais são as subespécies de micobactérias atípicas envolvidas na linfadenite granulomatosa em suínos no Brasil.
3. Verificar se existe correlação genética entre cepas de *MAH* isoladas neste estudo.
4. Pesquisar se há relação genética entre cepas de micobactérias encontradas em suínos e humanos no Brasil.
5. Pesquisar quais são as principais fontes de infecção dos suínos nas granjas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACLAND, H.M.; WHITLOCK R.H. *Mycobacterium avium* serotype 4 infection of swine: the attempted transmission by contact and the sequence of morphological changes in inoculated pigs. **Journal of Comparative Pathology**, vol. 96, p. 247–66, 1986.

AGDESTAIN, A. *et al.* Investigation of an outbreak of mycobacteriosis in pigs. **BMC Veterinary Research**, vol. 7:63, 2011.

AGDESTAIN, A. *et al.* A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs. **BMC Veterinary Research**, vol. 8 11, 2012.

AGDESTAIN, A. *et al.* Novel insights into transmission routes of *Mycobacterium avium* in pigs and possible implications for human health. **Veterinary Research**, vol. 45, 2014.

AMARAL, A.L. *et al.* Fatores de risco associados à ocorrência de linfadenite em suínos na fase de crescimento-terminação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 24, p. 120-122, 2004.

ANDREAZZA, D. *et al.* Caracterização histológica e imuno-histoquímica das lesões de tuberculose em bovinos e de linfadenite granulomatosa em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 129-136, 2015.

BAILEY, S.S. *et al.* *Mycobacterium bovis* infection in domestic pigs in Great Britain. **The Veterinary Journal**, vol. 198, p. 391-397, 2013.

BARANDIARAN, S. *et al.* Tuberculosis in swine co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium bovis* in a cluster from Argentina. **Epidemiology & Infection**, vol. 143, p. 966-974, 2015.

BERMUDEZ, L.E. *et al.* Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. **Infection and Immunity**, vol. 59,5, p. 1697-702, 1991.

BERMUDEZ, L.E.; WAGNER D.; SOSNOWSKA D. Mechanisms of *Mycobacterium avium* pathogenesis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, vol. 48, p. 521–527, 2000.

BOREKCI, G.; LEE, N.M. (2016). Rapid Microscope Based Identification Method for Tuberculosis and other Mycobacteria: Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) – Current State of The Art and Future Research Needs. **SMGroup**, Disponível em: <<https://smjournals.com/ebooks/tuberculosis/chapters/TB-16-15.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

BOUTRUP, T.S. *et al.* Early Pathogenesis in Porcine Proliferative Enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.143, p.101-109, 2010.

BOYE, M. *et al.* Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA *in situ* hybridization. **Molecular and Cellular Probes**, v.12, p.323-330, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Micobactéria de Importância Médica. Módulo VII. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. 2010. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/deteccao-e-identificacao-de-micobacterias-de-importancia-medica>>. Acesso em: 19 maio 2019.

BRASIL. Instrução Normativa nº 79, de 14 de dezembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento/Gabinete do Ministro, 17 dez. 2018. Disponível em: <<https://blog.ifopec.com.br/wp-content/uploads/2018/12/instrucao-normativa-no-79-de-14-de-dezembro-de-2018-diario-oficial-da-uniao-imprensa-nacional.pdf>>. Acesso em: 14 março 2018.

BRITO, A.C. 2013. Atividade antimicrobiana de diferentes fármacos contra *Mycobacterium abscessus* organizado em biofilmes ou localizada em fagossomos. Tese de doutorado em Ciências Departamento de análises clínicas e toxicológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 106p.

CAMPBELL, I.A. Opportunist (environmental) mycobacterial diseases. **Medicine (Baltimore)**, v. 36(6), p. 306–8, 2008.

CARDOSO, M. O que representam os suínos na transmissão de zoonoses para humanos? **Acta Scientiae Veterinariae**, vol. 1, s81-s89, 2009.

CASWELL, L. C.; WILLIAMS, K. J. Respiratory system. In: MAXIE M. G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6th ed., v. 2, p. 465-591, 2016.

CIACCI-ZANELLA, *et al.* Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polymerase e por imuno-histoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil, **Ciência Rural**, vol. 36, p. 1480-1485, 2006.

COLDEBELLA, A. *et al.* Reports of Brazilian Federal Meat Inspection System in swine slaughterhouses. In: **12th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork**, Foz do Iguaçu – PR. Anais 2017, p.251-254.

COSTA, E. de F.*et al.* **Avaliação qualitativa de riscos para priorização de perigos biológicos à saúde pública na cadeia de produção de suínos industriais**. Documento 186, ISSN 0101- 6245. Embrapa Suínos e Aves, 2017.

DHAMA, K. *et al.* Tuberculosis in Birds: Insights into the *Mycobacterium avium* Infections. **Veterinary Medicine International**, vol. 2011, 2011.

DOMINGOS, M.; AMADO, A.; BOTELHO A. IS1245 RFLP analysis of strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from pigs with tuberculosis lymphadenitis in Portugal. **Veterinary Record**, vol. 164, p. 11-120, 2009.

EISENBERG, T. *et al.* Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*. **Veterinary Microbiology**, vol. 159, p. 69-76, 2012.

ELLSWORTH, S.R. *et al.* *Mycobacterium avium* Abortion in Sow. **Veterinary Pathology**, vol. 16, p. 310-317, 1979.

ELMORE, S. Histopathology of the lymph nodes. **Toxicologic Pathology**, vol. 34, p. 425-454, 2006.

FALKINHAM, J.O. Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 107, p. 356-367, 2009.

FERRAZ, J.C. *et al.* Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 1397-1397, 2006.

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

FISCHER, O. *et al.* Findings of Mycobacteria in Insectivores and Small Rodents. **Folia Microbiologica**, vol. 45, p. 147-152, 2000.

FISCHER, O. *et al.* Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. **Medical and Veterinary Entomology**, vol. 15, p. 208-211, 2001.

FISCHER, O. *et al.* Nymphs of the Oriental cockroach (*Blattorientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. **Medical and Veterinary Entomology**, vol. 17, p. 145-150, 2003.

FISCHER, O. *et al.* Beetles as a possible vectors of infection caused by *Mycobacterium avium* species. **Veterinary Microbiology**, vol. 102, p. 247-255, 2004a.

FISCHER, O. *et al.* Beetles as a possible vectors of infection caused by *Mycobacterium avium* species. **Medical and Veterinary Entomology**, vol. 18, p. 116-122, 2004b.

FORBES, B.A. *et al.*, 2018. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 31, 2018.

GHIDINI, S. *et al.* Development and test of a visual-only meat inspection system for heavy pigs in Northern Italy. **BMC Veterinary Research**.14:6 (2018).

GUERRERO, C. *et al.* A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 33, p. 304-7, 1995.

GUNN-MOORE, D.A.; JENKINS, A.; LUCKE, V.M. Feline tuberculosis: a literature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. **Veterinary Record**, vol. 138, p. 53-58, 1996.

HERNÁNDEZ, A. *et al.* In vitro evaluation of Perafase® compared with 2% alkaline glutaraldehyde against *Mycobacterium* spp. **Journal of hospital infection**, v. 54, p. 52-56, 2003.

HIBIYA, K. *et al.* Histopathological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, vol. 31, p. 347-366, 2008.

INDERLIED, C.B.; KEMPER C.A.; BERMUDEZ, L.E.M. The *Mycobacterium avium* complex. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 6, pag. 266-310, 1993.

JENSEN, T.K. *et al.* Actinobacillus pleuropneumoniae osteomyelitis in pigs demonstrated by Fluorescent *in situ* hybridization. **Veterinary Pathology**, vol. 36, p. 258–261, 1999.

JENSEN, T.K. *et al.* Detection of Lawsonia intracellularis in Formalin fixed Porcine Intestinal Tissue Samples: Comparison of Immunofluorescence and In-situ Hybridization, and Evaluation of the Effects of Controlled Autolysis. **Journal of Comparative Pathology**. v.142, p.1-8, 2010.

JOHANSEN, T.B. *et al.* Biofilm formation by *Mycobacterium avium* isolates originating from humans, swine and birds. **BMC Microbiology**, vol. 9:159, 2009.

JOHANSEN, T.B. *et al.* New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. **BMC microbiology**, vol. 7, 2007.

KLANICOVA, B. *et al.* Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subspecies in meat products. **Journal of Food Protection**, vol. 74, p. 636-640, 2011.

KOMIJN, R.E. *et al.* Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 37, p. 1254-1259, 1999.

KRIZOVA, K. *et al.* Mycobacteria in the environment of pig farms in the Czech Republic between 2003 and 2007. **Veterinarni Medicina**, vol. 55, p. 55-69, 2010.

LARA, A.C.P. *et al.* Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). **Research in Veterinary Science**, vol. 90, p. 185–188, 2011.

LEFMANN, M. *et al.* Evaluation of Peptide Nucleic Acid-Fluorescence *In Situ* Hybridization for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria in Clinical Specimens and Tissue Sections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.10, p.3760-3767, 2006.

LUNA, L.G. 1968. Manual of Histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology.3rd ed. McGraw-Hill, New York, p.258.

MAPOTHER, M.E.; SANGER J.C. In vitro interaction of *Mycobacterium avium* with intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 45, pag. 67-73, 1984.

MARTINS, L. *et al.* Epidemiologia e controle das micobacterioses em suínos no sul do Brasil - estimativa do impacto econômico. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 69, p. 39-43, 2002.

MCDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and, resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-170, 1999.

MIJS, J. *et al.* Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for Bird-type isolates and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 52, p. 1505-1518, 2002

MOBIUS, P. *et al.* Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig and cattle. **Veterinary Microbiology**, vol. 117, p.284-291, 2006.

MONAGHAM, ML. *et al.* The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, vol. 40, p. 111-124, 1994.

MORATO, F. 2007. Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos utilizando a técnica de cultivo em camada de ágar Middlebrook 7H11. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 84p.

MORAVKOVA, M. *et al.* Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. **Research in Veterinary Science**, vol. 85, p. 257-264, 2008.

MORÉS, N. *et al.* Comparação entre métodos de tuberculinização no diagnóstico da infecção por agentes do Complexo *Mycobacterium avium* ou *M. bovis* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 58, p. 708-717, 2006.

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.

MORÉS, N.; OLIVEIRA, S.J. Micobacterioses. In: Sobestiansky, J.; Barcellos, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: CãnoneEditoria, 2007. p. 209-215.

ORME, I.M.; BASARABA R.J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. **Seminars in Immunology**, vol. 26, p. 601-609, 2014.

PAVLÍK, I. *et al.*, Tuberculous lesions in pig in teh Czech Republic during 1990-1999: occurrence, causal, factors and economic losses. **Veterinarni Medicina**, vol. 48, p. 113-125, 2003.

PEREIRA, C.E.R. *et al.* Mycoplasma hyorhinis infection in early cases of mycoplasma pneumonia in swine and evaluation of diagnostic assays. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1057-1063, 2017.

POLAČEK, V.; ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, S. Mycobacteriosis in pigs – na underrated threat. **Acta Veterinaria**, vol. 66, p. 429-443, 2016.

PORS, S.E. *et al.* Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.160–166, 2011.

RASOOL, G. *et al.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in AFB smear-negative sputum specimens through MTB culture and GeneXpert® MTB/RIF assay. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, vol. 33, 2019.

RINDI, L.; GARZELLI, C. Genetic Diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 21, p. 375-383, 2014.

RODRIGUEZ-NUÑES, J. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex detected by modified fluorescent *in situ* hybridization in lymph nodes of clinical samples. **The Journal of Infection in Developing Countries**, vol. 6, p. 58-66, 2011.

RYAN, G.J. *et al.* Multiple *M. tuberculosis* phenotypes in mouse and guinea pig lung tissue revealed by a dual-staining approach. *PLoS ONE*, 5, 2010.

SAKAMOTO, K. The pathology of Mycobacterium tuberculosis infection. **Veterinary Pathology**, vol. 49, p. 423-439, 2012.

SALES, M.L. *et al.* Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia Microbiologica**, vol. 59, p. 433-438, 2014.

SANGARI, F.J. *et al.* *Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes. **Infection and immunity**, vol. 69 3, p. 1515-20, 2001.

SAS INSTITUTE INC. System for Microsoft Windows, Release 9.4, Cary, NC, USA, 2002-2012. (cd-rom).

SCHWARZ P. *et al.* Ocorrência de surto de tuberculose causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* em uma criação de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol. 30, p. 197-200, 2002.

SHITAYE, J.E. *et al.* Mycobacterial and *Rhodococcusequi* infections in pigs in the Czech Republic between the years 1996 and 2004: the causal factors and distribution of infections in the tissue. **Veterinarni Medicina**, vol. 11, p. 497-511, 2006.

SILVA, V.S. *et al.* Identificação dos fatores de risco – associados à ocorrência de micobacterioses no sul do Brasil – Estudo caso-controle. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 68, p. 19-22, 2001.

SPILIOPOULOU, A. *et al.* Pulmonary infection by *Rhodococcusequi* presenting with positive Ziehl-Neelsen stain in a patient with human immunodeficiency vírus: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, vol. 8:423, 2014.

St. AMAND., A.L. *et al.* Use of specific rRNA oligonucleotide probes for microscopic detection of *Mycobacterium avium* complex organisms in tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 43, p. 1505-1514, 2005a.

St. AMAND., A.L. *et al.* Use of specific rRNA oligonucleotide probes for microscopic detection of *Mycobacterium tuberculosis* in culture and tissue specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 43, p. 5369-5371, 2005b.

STROMEVORA, N.H.; FALDYNA M. *Mycobacterium avium* complex infection in pigs: review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, p. 62-68, 2018.

TAKEWAKI, S *et al.* Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial dnaJ gene and species-specific oligonucleotide probes. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 31, p.446-50, 1993.

TIRKKONEN, T. *et al.* High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative IS1245 RFLP analysis. **Veterinary Microbiology**, vol. 125, p. 175-181, 2007.

TIRKKONEN, T. *et al.* Comparison of variable-number tandem-repeat markers typing and IS1245 restriction fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* from human and porcine origins. **Acta veterinaria Scandinavica** vol. 52, 2010.

TIRKKONEN, T. 2017. Porcine mycobacteriosis caused by *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*. Dissertação de doutorado em Clínica Veterinária, na Faculdade de Medicina de Helsinki, Finlândia. 45p.

TURENNE, C.Y.; WALLACE R.; BEHR M.A. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. **Clinical Microbiology Review**, vol. 20, p. 205-229, 2007.

VAN EMBDEN, J.D. *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of clinical microbiology**, vol. 31, p. 406-9, 1993.

WELLENBERG, G.J. *et al.* Multiple strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infections associated with aborted fetuses and wasting in pig. **Veterinary Record**, vol, 167, p. 451-454, 2010.

WOLF, A.J. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. **The Journal of Immunology**, vol. 179, p. 2509-19, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2015). Who estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. **World Health Organization, WHO, Switzerland.**Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/199350>>. Acesso em: 18 março 2019.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE).(2018). – Terrestrial Animal Health Code, Online version, OIE, Paris.Disponível em: <<http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 25 jan. 2019.