

**PATRÍCIA SAYURI MURAKAMI**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* EM QUATIS (*Nasua nasua*) E ANTAS (*Tapirus terrestris*)**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná – UFPR.**

**Orientador: Alexander Welker Biondo**

**CURITIBA**

**2007**

Murakami, Patrícia Sayuri

Identificação molecular de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em quatis (*Nasua nasua*) e antas (*Tapirus terrestris*) / Patrícia Sayuri Murakami.— Curitiba, 2007.

xi, 89 f.

Orientador: Alexander Welker Biondo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

1. Tuberculose em animais. 2. Doenças micobacterianas. 3. Quati – Doenças. 4. Anta - Doenças. I. Título.

CDU 619.6-002.5  
CDD 636.0896995

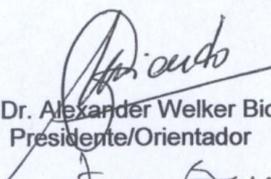
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



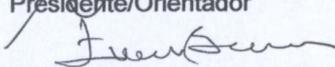
## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* EM ANTAS (*Tapirus terrestris*) E QUATIS (*Nasua nasua*)" apresentada pela Mestranda PATRÍCIA SAYURI MURAKAMI, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APROVADA (APTA) para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

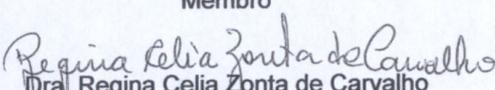
Curitiba, 23 de agosto de 2007



Prof. Dr. Alexander Welker Biondo  
Presidente/Orientador



Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho  
Membro



Dra. Regina Celia Zonta de Carvalho  
Membro

*A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.*  
(Horácio)

*Quem ama a verdade, procura formar a consciência: conhecer os princípios morais, pedir conselho a pessoas certas e com experiência; não considerar humilhante que nos corrijam. De fato, os outros nos observam de fora e com mais objetividade do que nós mesmos. Também é preciso tirar experiência dos próprios atos, examiná-los com frequência (diariamente) e corrigir os erros. É preciso ser humilde para reconhecer os erros e retificar, mas isso nos dará uma grande sabedoria, e capacidade de ajudar os outros também.*  
(Juan Luis Lorda)

## AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, e que tenho certeza, sem a colaboração de cada uma delas não teria chegado ao bom termo, o meu mais profundo agradecimento, em especial:

Aos meus pais pelo imenso amor, carinho e apoio que sempre forneceram para me tornar uma pessoa cada vez melhor.

Ao meu namorado, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me incentivando a seguir em frente, com infinita paciência, carinho, dedicação e amor.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e pelos incríveis momentos de descontração.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Alexander Welker Biondo por todo apoio, incentivo e esforço para minha formação acadêmica e crescimento profissional.

Ao meu comitê de orientação formado pelos professores Ivan Roque de Barros Filho e Rosângela Locatelli Dittrich por todas as correções e auxílio que tornaram meu trabalho melhor.

Às minhas orientadoras do Laboratório Central do Estado do Paraná, principalmente à Sueli Massumi Nakatani e Irina Nastassja Riediger, pela amizade, apoio, ensinamentos e confiança que depositaram, além da disponibilização do laboratório e dos materiais para o meu projeto.

À equipe do setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Estado do Paraná e do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, em especial à Sonia Regina Brockelt e à Sonia Maria Biesdorf, pelo fornecimento de cultivos para a padronização da técnica e pelas horas gastas com o cultivo das minhas amostras.

Ao professor Ricardo Guilherme D'Otaviano De Castro Vilani, pela contribuição para a realização de exames do Centro de Triagem de Animais Silvestres.

À veterinária Grazielle Cristina Garcia Soresini, do Centro de Triagem de Animais Silvestres, pelo auxílio e interesse na coleta de amostras e manipulação dos animais, e ainda pela disposição em fornecer informações e materiais relevantes à minha pesquisa.

Aos veterinários do Zoológico Municipal de Curitiba, em especial ao Manoel Lucas Javorouski, Marcelo Bonat e Oneida Lacerda, pelo interesse e disponibilização dos animais para a pesquisa.

À aluna de iniciação científica Renata Benício Neves Fuverki, que contribuiu muito para o trabalho com sua grande eficiência e boa vontade.

Aos animais, que foram as inspirações do meu projeto e estiveram presentes na minha pesquisa, contribuindo imensamente.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que fazem parte da minha vida e que sempre me dão forças para seguir em frente.

Muito obrigada a todos!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>PREFÁCIO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. CAPÍTULO 01 - TUBERCULOSE BOVINA: SAÚDE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA.....</b>	<b>2</b>
RESUMO .....	2
ABSTRACT.....	3
RESUMEN.....	4
1.1. INTRODUÇÃO.....	5
1.2. EPIDEMIOLOGIA .....	6
1.3. TRANSMISSÃO.....	7
1.4. IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO.....	9
1.5. PROGRESSÃO DA DOENÇA .....	11
1.6. LESÕES CLINICO-PATOLÓGICAS .....	13
1.7. DIAGNÓSTICO.....	15
1.8. CONTROLE.....	16
1.9. CONCLUSÃO .....	17
1.10. REFERÊNCIAS .....	18
<b>2. CAPÍTULO 2 - INFECÇÃO POR <i>Mycobacterium bovis</i> E <i>Mycobacterium tuberculosis</i> EM MAMÍFEROS SILVESTRES .....</b>	<b>22</b>
RESUMO .....	22
ABSTRACT.....	23
2.1. INTRODUÇÃO.....	24
2.2. EPIDEMIOLOGIA .....	25
2.2.1. No Mundo.....	25
2.2.2. No Brasil.....	26
2.3. FATORES DE RISCO.....	31
2.4. TRANSMISSÃO.....	32
2.5. ACHADOS CLÍNICOS .....	33

2.6. SAÚDE PÚBLICA .....	34
2.7. SAÚDE DE ANIMAIS DOMÉSTICOS.....	35
2.8. DIAGNÓSTICO.....	36
2.9. CONTROLE.....	38
2.10. CONCLUSÃO .....	39
2.11. REFERÊNCIAS .....	40
<b>3. CAPÍTULO 03 - IDENTIFICAÇÃO DE <i>Mycobacterium bovis</i> EM</b>	
<b>QUATIS (<i>Nasua nasua</i>) .....</b>	<b>44</b>
RESUMO .....	44
ABSTRACT.....	45
3.1. INTRODUÇÃO.....	46
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
3.2.1. Animais .....	48
3.2.2. Amostras .....	49
3.2.3. Tuberculinização .....	49
3.2.4. Cultivo Bacteriano e Baciloscopia .....	49
3.2.5. Reação em Cadeia da Polimerase.....	50
3.3. RESULTADOS .....	52
3.3.1. Achados Clínicos e Patológicos .....	52
3.3.2. Tuberculinização .....	53
3.3.3. Isolamento Bacteriano.....	53
3.3.4. PCR e Diferenciação de Espécies .....	54
3.4. DISCUSSÃO.....	55
3.5. CONCLUSÕES.....	58
3.6. REFERÊNCIAS .....	58
<b>4. CAPÍTULO 04 - IDENTIFICAÇÃO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	
<b>EM ANTAS (<i>Tapirus terrestris</i>) NO BRASIL .....</b>	<b>62</b>
RESUMO .....	62
ABSTRACT.....	63
4.1. INTRODUÇÃO.....	64
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	65
4.2.1. Histórico .....	65
4.2.2. Animais e Amostras .....	66

4.2.3. Tuberculinização dos Funcionários.....	67
4.2.4. Cultivo Bacteriano e Baciloscopia.....	67
4.2.5. Reação em Cadeia da Polimerase.....	68
4.3. RESULTADOS .....	69
4.3.1. Achados Clínicos .....	69
4.3.2. Tuberculinização .....	70
4.3.3. Isolamento Bacteriano.....	70
4.3.4. PCR e Diferenciação de Espécies .....	71
4.4. DISCUSSÃO.....	71
4.5. CONCLUSÕES.....	74
4.6. REFERÊNCIAS .....	75
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 2: Aprovação do projeto inicial na Fundação Araucária.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO 3: Solicitação de Autorização do Ibama (em trâmite).....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 4: Resumos apresentados no XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens – ABRAVAS, 2007.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO 5: Resumo aceito para o II Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária .....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA TUBERCULOSE (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> E <i>Mycobacterium bovis</i>) NOS PRINCIPAIS MAMÍFEROS SILVESTRES, NAS AMÉRICAS.....</b>	<b>28</b>
<b>TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DA TUBERCULOSE (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> E <i>Mycobacterium bovis</i>) NOS PRINCIPAIS MAMÍFEROS SILVESTRES, NA EUROPA.....</b>	<b>29</b>
<b>TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DA TUBERCULOSE (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> E <i>Mycobacterium bovis</i>) NOS PRINCIPAIS MAMÍFEROS SILVESTRES, NA ÁFRICA.....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 1 - RADIOGRAFIA TORÁCICA DE QUATI (<i>Nasua nasua</i>) COM AUMENTO DA RADIOPACIDADE PULMONAR, EVIDENCIANDO O PROCESSO RESPIRATÓRIO DA TUBERCULOSE.....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 2 - ABCESSOS PULMONARES MULTIFOCAIS E ENFISEMA PULMONAR EM QUATI (<i>Nasua nasua</i>), COMPATÍVEIS COM O QUADRO RESPIRATÓRIO DE TUBERCULOSE.....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DE LÂMINA COM COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN DE LAVADO BRONCOALVEOLAR DE QUATIS (<i>Nasua nasua</i>).....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5 % PARA COMPLEXO <i>M. tuberculosis</i> EM AMOSTRAS DE CULTIVO DOS QUATIS (<i>Nasua nasua</i>). .....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 5 - ANTAS (<i>Tapirus terrestris</i>) DO ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA, PARANÁ, BRASIL. A. MACHO. B. FÊMEA.....</b>	<b>67</b>
<b>FIGURA 6 - RADIOGRAFIAS PULMONARES DE ANTAS (<i>Tapirus terrestris</i>). A. MACHO. B. FÊMEA.....</b>	<b>70</b>
<b>FIGURA 7 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5 % PARA COMPLEXO <i>M. tuberculosis</i> EM AMOSTRAS DE CULTIVO DAS ANTAS (<i>Tapirus terrestris</i>). .....</b>	<b>71</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Cetas	Centro de Triagem de Animais Silvestres
cm	Centímetros
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ibama	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IFN-gama	Interferon-gama
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de Sódio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pmoles	Picomoles
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PPD	Derivado protéico purificado
U	Unidade
UFPR	Universidade Federal do Paraná

## RESUMO

A tuberculose afeta diversas espécies animais, inclusive os seres humanos, e é causada por microrganismos do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que apresenta grande importância em países onde a doença é endêmica, como no Brasil. O presente trabalho teve por objetivo a identificação de tuberculose em quatis (*Nasua nasua*) e antas (*Tapirus terrestris*). O estudo foi dividido em quatro capítulos; no **primeiro capítulo** foi apresentada uma revisão bibliográfica da tuberculose bovina, doença causada por *M. bovis*, que apresenta importância para saúde pública, saúde animal e produção animal. A implantação efetiva de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina é essencial para reduzir a prevalência e a incidência da doença, e ainda para reduzir os riscos de transmissão de animais para seres humanos. No **segundo capítulo** foi realizada uma revisão bibliográfica da tuberculose em animais silvestres, mostrando a variedade de espécies susceptíveis e ainda uma carência de estudos no Brasil. No **terceiro** e no **quarto capítulos**, foram descritas respectivamente, a identificação de *M. bovis* em quatis do Centro de Triagem de Animais Silvestres de Tijucas do Sul e a identificação de *M. tuberculosis* em antas do Zoológico Municipal de Curitiba. A interpretação conjunta dos testes laboratoriais *ante* e *post-mortem* de cultivo bacteriológico, baciloscopia e reação em cadeia da polimerase (PCR), associadas à tuberculinização e radiografias pulmonares, foram essenciais para o diagnóstico definitivo da tuberculose nesses animais. O presente estudo constitui, de conhecimento do autor, as primeiras descrições da doença nestas espécies no Brasil, e demonstra que populações silvestres suscetíveis podem ser negativamente afetadas pelo aumento da concentração em cativeiro, proximidade de pessoas, animais domésticos e outras espécies silvestres. Ao mesmo tempo, estes animais podem ser fontes potenciais de infecção para outros animais e seres humanos. **Em conclusão**, o diagnóstico da tuberculose em quatis e antas demonstra a importância desta doença em saúde pública e saúde animal, em particular na manutenção das espécies silvestres em cativeiro.

**Palavras-chave:** diagnóstico, *Nasua nasua*, *Tapirus terrestris*, tuberculose.

## ABSTRACT

Tuberculosis affects several animal species, including human beings, and is caused by microorganisms of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, which presents great importance in countries where the disease is endemic, as in Brazil. The present work had as objective the identification of tuberculosis in coatis (*Nasua nasua*) and tapirs (*Tapirus terrestris*). The study was divided in four chapters; **in the first chapter** a literature review of bovine tuberculosis is presented, disease caused by *M. bovis*, which is essential for public health, animal health and animal production. The effective establishment of bovine tuberculosis control and eradication programs is of importance for disease prevalence and incidence reduction, and also to reduce risks of transmission from animals to human beings. In the **second chapter** a literature review of tuberculosis in wildlife animals was performed, showing the variety of susceptible species and still a lack of studies in Brazil. In the **third and fourth chapters**, the respective identification of *M. bovis* in coatis from the Wildlife Screening Center of Tijucas do Sul and the identification of *M. tuberculosis* in tapirs from the Curitiba Zoo. The comprehensive interpretation of laboratory tests *ante* and *post-mortem* of bacteriologic culture, bacilloscopy and polymerase chain reaction (PCR), associated to tuberculine test and pulmonary radiographies, were crucial for the definitive diagnosis of tuberculosis in these animals. The present study, to the author knowledge, is the first report of tuberculosis in these species in Brazil, and demonstrates that susceptible wildlife populations may be negatively affected by the increased concentration in captivity, proximity to people, domestic and other wildlife captive animals. At the same time, these animals may be potential source of infection to other animals and human beings, impeding the adequate control of the disease, particularly in the maintenance of wildlife species in captivity. **In conclusion**, the tuberculosis diagnosis in coatis and tapirs demonstrates the importance of this disease in public health and animal health, particularly in the maintenance of captive wildlife species.

**Keywords:** diagnosis, *Nasua nasua*, *Tapirus terrestris*, tuberculosis.

## PREFÁCIO

Os microrganismos do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em especial *M. bovis* e *M. tuberculosis*, causam infecção crônica grave, de abrangência mundial, denominada tuberculose. Essas espécies podem afetar seres humanos, animais domésticos e ainda animais silvestres, tanto de vida livre como de cativeiro.

Para elucidar a doença e sua importância em criações de bovinos, no **primeiro capítulo**, foi realizada uma revisão bibliográfica, priorizando a infecção por *Mycobacterium bovis* e suas implicações em saúde pública e saúde animal.

No **segundo capítulo**, foi feita uma revisão da tuberculose em animais silvestres, com relatos da doença no mundo e na fauna brasileira, com especial atenção para epidemiologia, transmissão, fatores de risco, achados clínicos, relação com saúde pública e saúde de animais domésticos, diagnóstico e controle.

No **terceiro e quarto capítulos** foi realizado o estudo central da presente dissertação, tendo por objetivo a avaliação dos métodos de diagnóstico molecular aplicados a animais silvestres, em particular para a diferenciação entre as diversas espécies do Complexo *M. tuberculosis*. A técnica molecular foi utilizada em associação a radiografias pulmonares e testes de tuberculinização, além de outros métodos laboratoriais como baciloscopia e cultivo bacteriano, para uma identificação mais precisa do agente causador da tuberculose.

Na **conclusão**, foi enfatizada a importância da identificação desses microrganismos em animais silvestres, em particular em espécies da fauna brasileira.

## 1. CAPÍTULO 01 - TUBERCULOSE BOVINA: SAÚDE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA

(Trabalho submetido para publicação – Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Universidade Paranaense)

### RESUMO

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa de abrangência mundial que afeta seres humanos e outras diversas espécies animais. A principal espécie infectante dos bovinos é *Mycobacterium bovis*, que é endêmica no Brasil e causa prejuízos econômicos por redução da produtividade do rebanho e perdas de carcaças no frigorífico. Ainda, por se tratar de uma zoonose, *M. bovis* pode infectar seres humanos, causando uma doença clinicamente e patologicamente indistinguível da infecção por *M. tuberculosis*. Apesar da carência de informações da relevância da tuberculose bovina para os seres humanos, o aumento do número de pacientes imunossuprimidos no país, principalmente pelo vírus da imunodeficiência humana, causa preocupação em relação a doenças causadas por espécies atípicas. A espécie *M. bovis* é transmitida principalmente por via aerógena para bovinos e pelo consumo de leite e derivados crus para pessoas. A imunidade do hospedeiro contra os bacilos da tuberculose envolve uma variedade de eventos celulares, podendo resultar em apresentações clínicas e patologia diferenciada, variando desde infecções autolimitantes até doença sistêmica grave. O diagnóstico em bovinos é realizado principalmente por tuberculinização, entretanto é importante realizar a identificação laboratorial da espécie causadora da doença. Embora programas de controle e erradicação tenham sido implantados apenas na última década no país, o controle da tuberculose é fundamental para saúde pública, saúde animal e produção animal.

**PALAVRAS-CHAVE:** bovinos, *Mycobacterium bovis*, saúde animal, saúde pública, tuberculose.

## BOVINE TUBERCULOSIS: ANIMAL HEALTH AND HUMAN HEALTH

### ABSTRACT

Tuberculosis is a worldwide infectious disease that affects human beings and several other animal species. The main species infecting bovine is *Mycobacterium bovis*, which is endemic in Brazil and causes economic losses due to productivity reduction and losses at the slaughterhouse. Since tuberculosis is a zoonosis, *M. bovis* may infect human beings, causing a clinically or pathologically disease indistinguishable from *M. tuberculosis* infection. Despite the lack of information about bovine tuberculosis relevance to human beings, immunosuppressed patients increasing in the country, mainly due to human immunodeficiency virus, causes concern about diseases caused by atypical species. *Mycobacterium bovis* specie is mainly transmitted by respiratory route to cattle and by raw milk and other products to human beings. The host immunity against tuberculosis bacillus includes a variety of cellular events, and may result in differentiated clinical and pathology results, ranging from self-limiting infection to severe systemic disease. Bovine diagnosis is mainly by tuberculinization, however, differentiate the infecting specie is important. Although control and eradication programs have been implanted only in the last decade in the country, tuberculosis control is essential for both public and animal health.

KEY-WORDS: cattle, *Mycobacterium bovis*, animal health, public health, tuberculosis.

## TUBERCULOSIS BOVINA: SALUD ANIMAL Y SALUD PÚBLICA

### RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial que afecta seres humanos y otras diversas especies animales. La principal especie infectante de los bovinos es el *Mycobacterium bovis*, la cual es endémica en Brasil y causa pérdidas económicas por reducción de la productividad del rebaño y pérdidas de carcasas en el frigorífico. Además, por ser una zoonosis, *M. bovis* puede infectar a seres humanos, causando una enfermedad clínicamente e patológicamente indistinguible de la infección por *M. tuberculosis*. A pesar de la falta de información sobre la importancia de la tuberculosis bovina para los seres humanos, el aumento en el número de pacientes inmunodeprimidos en el país, principalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana, causa preocupación en relación a enfermedades causadas por especies atípicas. La especie *M. bovis* es transmitida principalmente a través de la vía respiratoria para bovinos y a través del consumo de leche y derivados crudos para personas. La inmunidad del hospedador contra los bacilos de la tuberculosis incluye una variedad de eventos celulares, los cuales pueden resultar en presentaciones clínicas y patología diferenciada, variando desde infecciones auto-limitantes hasta enfermedad sistémica grave. El diagnóstico en bovinos se realiza principalmente a través de la prueba de la tuberculina, sin embargo es importante realizar la identificación en laboratorio de la especie causante de la enfermedad. Aunque programas de control y erradicación hayan sido implementados apenas en la última década en el país, el control de la tuberculosis es fundamental para la salud pública, salud animal y producción animal.

**PALABRAS-CLAVE:** bovinos, *Mycobacterium bovis*, salud pública, salud animal, tuberculosis.

## 1.1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença de abrangência mundial causada por microrganismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (Actinomycetales, Mycobacteriaceae), apresentando aproximadamente 100 espécies descritas (MATTHIAS, 1988). Embora vários microrganismos sejam saprófitas, muitas dessas micobactérias são patogênicas tanto para os seres humanos como para os animais (JONES *et al.*, 1997). A espécie *Mycobacterium bovis*, juntamente com *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium canettii* e *Mycobacterium microti*, formam o “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*” (HUARD *et al.*, 2003), grupo responsável pela maioria dos casos de tuberculose humana e animal. A infecção causada por *Mycobacterium bovis* ou tuberculose bovina, afeta uma ampla variedade de hospedeiros, principalmente causando prejuízos econômicos para a pecuária, além de infecções atípicas em seres humanos com sistema imune comprometido (O'REILLY e DABORN, 1995). A doença em pessoas causada por *M. bovis* é também denominada de tuberculose zoonótica. Já *M. tuberculosis* possui um espectro mais restrito de hospedeiros (NEILL *et al.*, 2005), podendo ser o agente ocasional em bovinos que vivem em contato próximo com seres humanos.

Recentemente, avanços no campo da biologia molecular e nos estudos experimentais trouxeram novos esclarecimentos em relação à tuberculose. O objetivo deste texto é oferecer uma descrição da infecção por *M. bovis* em bovinos e suas implicações zoonóticas para seres humanos, além da possível, mas rara, infecção em bovinos por *M. tuberculosis*. Para tanto, serão abordados epidemiologia, modo de transmissão, imunidade do hospedeiro, progressão da doença, lesões clínico-patológicas, diagnóstico e controle da tuberculose nessas espécies.

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA

Inicialmente, acreditava-se que a domesticação do gado bovino, a qual ocorreu entre 10 mil e 25 mil anos atrás, teria permitido a passagem de um patógeno micobacteriano de animais domésticos para seres humanos. Em sua adaptação a um novo hospedeiro, a bactéria teria evoluído para uma espécie mais próxima de *M. tuberculosis* (NEILL *et al.*, 2005). Entretanto, estudos genéticos atuais de distribuição de deleções e inserções nos genomas do Complexo *M. tuberculosis*, fornecem fortes evidências para uma evolução independente tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis*, partindo de uma outra espécie precursora comum, possivelmente *M. canettii* (BROSCH *et al.*, 2002).

A importância econômica atribuída à doença bovina está baseada nas perdas diretas e indiretas resultantes da morte de animais, da queda no ganho de peso, da diminuição da produção de leite, do descarte precoce, da eliminação de animais de alto valor zootécnico e da condenação de carcaças no abate. Estima-se que os animais infectados percam de 10 % a 25 % de sua eficiência produtiva. Existe ainda a perda de prestígio e credibilidade da unidade de criação onde a doença é constatada (BRASIL, 2006).

No Brasil, estima-se a existência de 200 mil bovinos infectados entre uma população total de aproximadamente 170 milhões (LEITE *et al.*, 2003). Dados de notificações oficiais indicam uma prevalência média nacional de 1,3 % de animais reagentes à tuberculina no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006).

A tuberculose bovina é importante não apenas devido aos prejuízos econômicos, mas também pelo fato de ser uma fonte de infecção para seres humanos (ACHA e SZYFRES, 2003). Como zoonose, suspeita-se que a infecção pelo patógeno seja responsável por mais de 4 mil de aproximadamente 100 mil casos de tuberculose humana descritos anualmente no Brasil (LEITE *et al.*, 2003). Os seres humanos parecem ser tão susceptíveis a *M. bovis* quanto a *M. tuberculosis* (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994). Atualmente, o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e outros tipos de imunossupressão ocasionados por fatores como quimioterapia ou transplante de órgãos (MATTOS *et al.*, 2006) são associados com o grande aumento no risco de doença observável em seres humanos infectados por

*M. tuberculosis*. Acredita-se que esse aumento no risco ocorre também no caso das infecções por *M. bovis* em seres humanos (O'REILLY e DABORN, 1995).

De acordo com alguns estudos, a infecção ocasional causada por *M. tuberculosis* em bovinos pode ocorrer acidentalmente e a prevalência não excede 1% na maioria dos casos (OCEPEK *et al.*, 2005).

### 1.3. TRANSMISSÃO

A dose de *M. bovis* a qual bovinos são expostos pode ser altamente variável, devido a diferenças individuais do animal, cepa bacteriana e rota de inoculação (PALMER e WATERS, 2006). Possíveis rotas de infecção por *M. bovis* são respiratórias, alimentares, congênitas, cutâneas e venéreas. Na prática, a infecção nos bovinos em geral é adquirida quase exclusivamente pela via aerógena, pela inalação de gotículas infectadas de tosse ou secreção nasal de um animal com tuberculose pulmonar ativa (NEILL *et al.*, 1994). A via oral é geralmente mais importante em bezerros amamentando-se em vacas tuberculosas (PALMER e WATERS, 2006). Em casos de infecção congênita, a transmissão acontece via vasos sangüíneos umbilicais para o feto, a partir da infecção presente no útero da fêmea (NEILL *et al.*, 1994); mais raramente, também pode ocorrer adquirida como resultado tanto de deglutição do líquido amniótico infectado, que leva ao desenvolvimento de lesões nos intestinos ou nos linfonodos mesentéricos, como por inalação, que resulta em doença pulmonar (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994). Em ocasiões raras, transmissão genital ocorre nos bovinos se tanto os órgãos sexuais masculinos ou femininos são tuberculosos, ou possivelmente se o orifício prepucial está infectado, por exemplo, por solo contaminado (NEILL *et al.*, 1994).

Infecções por *M. bovis* em seres humanos podem ser adquiridas mais comumente por consumo de leite e derivados crus (ACHA e SZYFRES, 2003), levando ao desenvolvimento de doença extrapulmonar (GRANGE *et al.*, 2001). Estudos de virulência em ratos sugerem que *M. bovis* seja mais virulento que *M. tuberculosis* e isso pode se manifestar como maior habilidade para causar doença extrapulmonar (MEDINA *et al.*, 2006). O risco é maior para crianças, idosos e pessoas com deficiência imunológica (BRASIL, 2006). No entanto, grupos

ocupacionais que trabalham com bovinos infectados com *M. bovis*, em fazendas ou abatedouros, também podem desenvolver a doença, mais provavelmente na forma pulmonar (O'REILLY e DABORN, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2005). Formas pulmonares e extrapulmonares de tuberculose humana de origem animal continuam a ser um problema em áreas onde a prevalência da infecção nos bovinos é alta, porque nem todo leite consumido é fervido, muitos derivados são produzidos com leite não pasteurizado, e alguns casos de infecção são adquiridos via aerossol nos seres humanos em contato freqüente com os animais doentes (PARDO *et al.*, 2001; ACHA e SZYFRES, 2003). No entanto, bovinos não são a única fonte de *M. bovis*. Seres humanos têm sido infectados por contato com outros animais como alces, mamíferos marinhos e rinocerontes. Ainda, seres humanos com tuberculose ativa devido a *M. bovis*, podem infectar novamente os bovinos, principalmente em contato próximo pela via respiratória (GRANGE *et al.*, 2001). A transmissão entre pessoas de *M. bovis* é possível, mas poucos casos têm sido confirmados, pois geralmente são hospedeiros acidentais e dependem de uma fonte animal (ACHA e SZYFRES, 2003). Além disso, comprovar tal transmissão é muito difícil, pois podem demorar muitos anos desde a infecção até o desenvolvimento da doença (GRANGE *et al.*, 2001).

A infecção por *M. tuberculosis* em bovinos é rara, mas pode haver transmissão aerógena para bovinos em contato próximo com seres humanos infectados que estejam disseminando o agente (OCEPEK *et al.*, 2005).

Doenças de disseminação aerógena, como a tuberculose, são particularmente infectantes tanto para bovinos como para seres humanos, pois as pequenas gotículas geradas pela tosse não apenas transpassam as defesas do sistema respiratório superior, como permanecem no ar muito mais tempo que partículas maiores (SALYERS e DIXIE, 2002). Em infecções por via aerógena, bactérias são inaladas no núcleo do aerossol. Apenas gotículas de dois a cinco micrômetros de diâmetro têm a habilidade de alcançar os espaços alveolares dos pulmões, onde são depositadas e as bactérias existentes são ingeridas pelos macrófagos. Partículas maiores são contidas no trato respiratório superior (PALMER e WATERS, 2006) e removidas pelo sistema mucociliar, sendo eliminadas posteriormente pelo trato gastrointestinal (HUCHZERMAYER *et al.*, 1994). Outro aspecto comprovado é que a infecção pela da via oral exige doses muito maiores

(cerca de 10 a 20 milhões de bacilos), do que a requerida para via aerossol, na qual são necessários apenas um a cinco bacilos para causar a infecção (PALMER e WATERS, 2006).

#### 1.4. IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO

A patogênese da tuberculose bovina não é tão bem entendida quanto da doença humana. Avanços no campo da tuberculose têm sido feitos utilizando-se vários modelos de pequenos animais com infecção por *M. tuberculosis* (CASSIDY, 2006). A extrapolação dos achados nesses modelos tem sido feita para a tuberculose bovina. Tais extrapolações nem sempre podem ser apropriadas, já que existem profundas diferenças na suscetibilidade, ambiente, ecologia e comportamento do hospedeiro (PALMER e WATERS, 2006). Para solucionar isso, bovinos e outros animais de grande porte têm sido utilizados como modelos experimentais para reproduzir com maior fidelidade a infecção (NEILL *et al.*, 2001). Em relação à doença causada por *M. bovis* em seres humanos, ela é clinicamente e patologicamente indistinguível da doença causada por *M. tuberculosis* (RUA-DOMENECH, 2006). Na presente revisão, foi priorizada a infecção pulmonar em bovinos por *M. bovis* com particularidades da infecção em seres humanos.

A resposta imune dos bovinos durante a infecção por *M. bovis* é extremamente complexa e dinâmica, envolvendo uma variedade de eventos celulares, resultando em apresentações clínicas e patológicas marcadamente diferenciadas de forma individual nos animais (NEILL *et al.*, 2001). Os efeitos de uma resposta imune altamente específica resultam em um espectro de lesões variando desde infecções autolimitantes até doença sistêmica grave (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994).

Nos pulmões, a presença dos bacilos estimula a resposta imune inespecífica do organismo, que é caracterizada pela fagocitose dos microrganismos pelos macrófagos pulmonares não ativados (ADEREM e UNDERHILL, 1999). Reconhecidamente, o macrófago representa um papel vital nos estágios iniciais da reação típica do hospedeiro em resposta ao bacilo da tuberculose (NEILL *et al.*, 2001). O sucesso inicial da eliminação das micobactérias depende das atividades

bactericidas dos macrófagos infectados. Quando os macrófagos infectados morrem, os bacilos liberados são novamente fagocitados por macrófagos adjacentes. A habilidade dos macrófagos em inativar as micobactérias é melhorada apenas após o desenvolvimento de uma hipersensibilidade do tipo tardia, acionada pelos antígenos bacterianos (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994). A estrutura da parede celular das micobactérias, que é um fator importante de antigenicidade, é extremamente complexa, contendo muitas proteínas, lipídios e carboidratos, sendo muitos deles exclusivos dessas bactérias (BRENNAN e NIKAIDO, 1995; DAFTE e DRAPER, 1998).

A apresentação de antígenos estabelece o início da ativação da resposta imune específica, que pode ser mediada por anticorpos ou por células (NEILL *et al.*, 2005). Após a sensibilização, que pode ocorrer a partir de duas semanas após a infecção inicial, linfócitos liberam linfocinas que atraem, ativam e aumentam o número de células mononucleares no local da infecção (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994). Os macrófagos ativados alteram sua conformação e passam a secretar grandes quantidades de citocinas, enzimas e óxido nítrico, tornando-se mais eficazes no combate dos microrganismos (TIZARD, 2002). Está evidente que respostas mediadas por imunidade celular são normalmente dominantes após a infecção (POLLOCK e NEILL, 2002). A ativação da resposta imune específica por células é de grande importância, uma vez que linfócitos T-helper (CD4+) e linfócitos T citotóxicos (CD8+) são estimulados e participam ativamente da resposta imunológica contra os bacilos infectantes (NEILL *et al.*, 1994). A principal contribuição dos linfócitos T-helper (CD4+) para controlar uma infecção parece ser a produção de Interferon-gama (IFN-gama), que estimula a ativação dos macrófagos, e a ligação das células endoteliais nas células T, incitando seu movimento de fora da corrente sangüínea para os tecidos adjacentes, para que eles possam convergir para a área infectada (SALYERS e DIXIE, 2002). Nos seres humanos, o exemplo mais claro do papel fundamental destas células é a infecção humana pelo HIV, onde existe uma diminuição dos linfócitos T CD4+, provocando uma grande susceptibilidade a primo-infecção ou à reativação de uma tuberculose prévia (CREVEL *et al.*, 2002). Os linfócitos T citotóxicos (CD8+), fazem parte igualmente dos mecanismos celulares que intervêm na resposta imune à infecção, funcionando como células citotóxicas efetoras. O principal papel atribuído a esta população é a

lise das células infectadas nas lesões que ainda contêm algumas bactérias, para que possam ser fagocitadas e mortas por macrófagos ativados (SALYERS e DIXIE, 2002). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> também secretam grande quantidade de IFN-gama, que ajuda a manter ativados os vários sistemas responsáveis pela eliminação dos microrganismos da célula hospedeira (POLLOCK e NEILL, 2002).

### 1.5. PROGRESSÃO DA DOENÇA

Como discutido anteriormente, o núcleo do aerossol inspirado se aloja no trato respiratório e quando os bacilos alcançam os alvéolos pulmonares, são fagocitados pelos macrófagos e começam a se dividir e aumentar em número no foco de inoculação. Embora a fagocitose ocorra sem maiores problemas e parte dos bacilos seja destruída, um maior contingente permanece vivo e se multiplica dentro dos fagossomos do macrófago, pois glicolipídeos micobacterianos impedem sua fusão aos lisossomos, que contêm enzimas capazes de destruir o bacilo (JONES *et al.*, 1997). Alguns extratos de glicolipídeos das bactérias inibem a quimiotaxia e são leucotóxicos, enquanto outros promovem a sobrevivência intracelular das bactérias nos macrófagos pela inibição da formação do fagolisossomo (CASSIDY, 2006). A multiplicação bacilar provoca a morte do macrófago com liberação de lisossomos e destruição tecidual (NEILL *et al.*, 2001).

Após a multiplicação dos bacilos uma lesão primária ou foco de infecção é estabelecido devido à interação do hospedeiro e do patógeno. Essa lesão primária, juntamente com a lesão no linfonodo regional é denominada de “complexo primário” (NEILL *et al.*, 1994). O envolvimento do bacilo resulta na formação de uma lesão chamada de granuloma. Neutrófilos inicialmente entram no desenvolvimento do granuloma, mas são rapidamente substituídos por macrófagos mononucleares (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994). Os macrófagos circunjacentes assumem um aspecto diferente, com um citoplasma eosinofílico abundante, quando então são denominadas de células epitelióides. A coalescência das células epitelióides leva à presença de células gigantes multinucleadas, denominadas de células gigantes de Langhans (JONES, 1997), que são envoltos por uma zona de linfócitos e outras

células mononucleares. Frequentemente há proliferação de tecido conectivo na periferia, que tende a encapsular a lesão (CASSIDY, 2006).

Com o aumento do tamanho do granuloma, as células centrais sofrem necrose caseosa, rica em lipídios degradados da parede celular das micobactérias. Pode ocorrer calcificação no centro caseoso do tubérculo (JONES *et al.*, 1997). Nestas condições, os bacilos podem sobreviver por anos em estado de latência e o indivíduo infectado pode não manifestar a doença, pois a multiplicação dos bacilos tende a ser inibida nas lesões que contêm exsudato caseoso. No entanto, se este vier a se tornar liquefeito, sua multiplicação pode ser profusa. Isso pode ocorrer por causa dos efeitos de enzimas hidrolíticas dos macrófagos e neutrófilos. Esse material liquefeito é um excelente meio de cultura para os bacilos e contém um grande número deles (CASSIDY, 2006). Como um líquido é muito mais facilmente passado para os aerossóis que o material caseoso, um indivíduo com lesões liquefeitas é muito mais contagioso que um indivíduo cuja lesão esteja no estágio de necrose caseosa. Ainda, a consistência fina de uma lesão caseosa previne o movimento da bactéria para fora da área. As bactérias em uma lesão liquefeita podem escapar mais prontamente das lesões e se disseminar por via hematogênica para outras partes do corpo, causando a forma disseminada da doença ou tuberculose miliar. Essa é a forma mais grave, que ocorre em indivíduos imunologicamente deficientes, caracterizada por doença aguda e muitas vezes fatal (SALYERS e DIXIE, 2002).

Macrófagos vivos e infectados, também podem entrar no sangue e veias linfáticas, ductos ou cavidades e então podem disseminar a infecção para outros órgãos (NEILL *et al.*, 2005). À medida que a lesão envelhece, o tecido conjuntivo colagenoso que circunda a lesão aumenta em quantidade e maturidade. Se as bactérias forem eliminadas, o tubérculo será reduzido a uma pequena massa de tecido cicatricial hialino. Contudo, mesmo com a cura, os microrganismos podem não ter sido completamente eliminados, e persistem na forma de infecção latente (POLLOCK e NEILL, 2002). Posteriormente, após a infecção primária, pode ocorrer a reativação da doença. O indivíduo já apresenta memória imunológica para os antígenos dos bacilos da tuberculose e, em geral, desenvolve lesão mais circunscrita, de evolução mais lenta (MATTHIAS, 1988).

Em relação à infecção por *M. tuberculosis*, os bovinos são muito resistentes. O agente não causa uma doença progressiva nesses animais, mas os bacilos podem sobreviver por algum tempo em seus tecidos, principalmente nos linfonodos, sensibilizando o animal e podendo gerar reação cruzada no teste de tuberculinização para tuberculose bovina (ACHA e SZYFRES, 2003).

## 1.6. LESÕES CLINICO-PATOLÓGICAS

A tuberculose pode causar uma grande diversidade de sinais clínicos tanto em bovinos como em seres humanos. Muitas infecções causam muito pouco, se algum, sinal clínico, enquanto outras demonstram sintomatologia amplamente diferenciada por causa da variação da localização das lesões (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994).

Na maioria dos rebanhos infectados por *M. bovis* a doença é inaparente, e a sua presença somente é detectada pelo teste tuberculínico. A maior parte das lesões nos bovinos está nos pulmões, linfonodos pulmonares e linfonodos craniais (PALMER e WATERS, 2006), onde freqüentemente a calcificação é importante (JONES *et al.*, 1997). As lesões primárias podem ser únicas ou múltiplas, podem envolver o pulmão direito ou esquerdo e podem ser uni ou bilaterais (NEILL *et al.*, 1994). As lesões pela tuberculose são encontradas principalmente no topo da região dorsocaudal dos pulmões, próximas à superfície pleural (PALMER e WATERS, 2006). A dispnéia pode ser aparente em casos avançados, nos quais extensas lesões pulmonares levam ao enfraquecimento das funções respiratórias ou linfonodos bronquiais aumentados causam obstrução das vias aéreas. Na pleura ou no mesentério, a disseminação é causada tanto por via hematogênica como pela liberação da bactéria dos locais próximos, por movimentos pulmonares ou peristálticos intestinais, causando lesões nodulares difusas, caseosas, em placas ou agrupadas (MATTHIAS, 1988).

Quando a infecção ocorre por membranas mucosas, como na faringe e intestino, a lesão inicial na membrana mucosa pode não ser visível, enquanto as lesões nos linfonodos são óbvias (DUNGWORTH, 1993; PALMER e WATERS, 2006). Lesões no trato gastrointestinal, quando aparentes, se manifestam como

nódulos ou úlceras na mucosa do trato digestório superior, abomaso, intestino delgado ou grosso após uma infecção via oral, ou podem ser secundários à infecção pulmonar. O timpanismo pode ocorrer como resultado de pressão no esôfago pelo aumento dos linfonodos mediastinais. A tuberculose generalizada é caracterizada pela presença de lesões miliares em órgãos e linfonodos por todo o organismo, sendo pequenas e transparentes nos estágios iniciais, mas tornam-se caseosas e calcificadas com o tempo. O envolvimento hepático também pode ser seguido da bacteremia e os rins podem estar envolvidos de forma semelhante, no qual lesões miliares são limitadas ao córtex. Em alguns animais jovens ocorre osteomielite, particularmente nas vértebras, arcos costais e ossos chatos da pelve, podendo drenar pelas fístulas no córtex do osso afetado causando miosite e artrite na região (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994).

Ainda, a endometrite como resultado da tuberculose pode causar infertilidade ou resultar em aborto nos estágios finais da prenhez (MATTHIAS, 1988). Também pode ocorrer tuberculose congênita, na qual o complexo primário está presente no fígado e nos linfonodos portais, embora lesões primárias nem sempre estejam aparentes. Como a doença se desenvolve rapidamente e se torna disseminada, os animais jovens morrem em algumas semanas ou meses (NEILL, *et al.*, 1994).

Ainda, a infecção pelo bacilo da tuberculose nem sempre resulta na formação de tubérculos típicos como no caso da tuberculose nas meninges, uma infecção rapidamente fatal, na qual as alterações patológicas consistem de um exsudato fibrinoso ou fibrinopurulento escasso na superfície da pia-máter e presença de células epitelióides nas meninges, que pode ser conseqüente a uma disseminação hematogênica ou ocorrer por extensão das lesões vertebrais (JONES *et al.*, 1997).

Da mesma forma, uma vez que a lesão da tuberculose se desenvolve em um determinado órgão, a aparência e o curso da doença são os mesmos em seres humanos, indiferente à espécie da micobactéria causadora ser *M. tuberculosis* ou *M. bovis* (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994). Em pessoas imunocompetentes, *M. bovis* causa principalmente formas crônicas da tuberculose, linfadenite e lesões cutâneas e subcutâneas. No entanto, em pacientes imunodeficientes, a doença pode evoluir para um quadro grave e disseminado (ACHA e SZYFRES, 2003).

Em relação à infecção por *M. tuberculosis*, geralmente causa doença autolimitante em bovinos, nos quais as lesões normalmente estão presentes nos

linfonodos e não excedem 20 mm de diâmetro (ACHA e SZYFRES, 2003). Lesões ocasionais e pequenas podem ser encontradas nos pulmões e nos intestinos de bezerras. Doença observável e progressiva raramente é encontrada (GRANGE *et al.*, 2001).

## 1.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose em bovinos pela tuberculinização intradérmica como teste a campo, indicada pela resposta imune mediada por células, tem representado um papel fundamental em programas de erradicação, como o primeiro teste diagnóstico (NEILL *et al.*, 2001). Métodos laboratoriais como baciloscopia e cultivo bacteriano também são rotineiramente utilizados (BRASIL, 2006).

No entanto, nenhum desses testes identifica a espécie de micobactéria infectante. Distinguir entre os vários membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* é essencial para investigação epidemiológica de casos humanos e bovinos e, em um menor grau, para quimioterapia mais adequada para pacientes humanos (OCEPEK *et al.*, 2005; RUA-DOMENECH, 2006). Em áreas endêmicas, onde a tuberculose bovina e a humana coexistem, a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante no monitoramento da dispersão de *M. bovis* entre os bovinos e deles para os seres humanos (LEITE *et al.*, 2003).

Realizar a diferenciação entre os organismos que causam a tuberculose bovina e humana não é uma tarefa simples. Dentre os principais problemas na diferenciação das micobactérias quanto à espécie causal, estão a diversidade de técnicas e testes que são necessários, além do tempo necessário para identificação completa (TELENTI *et al.*, 1993). Uma série de testes clássicos baseados em crescimento, propriedades fenotípicas e bioquímicas tem sido tradicionalmente utilizada para segregar os membros do Complexo *M. tuberculosis* (RUA-DOMENECH, 2006). Entretanto, conjuntamente, esses testes podem ser lentos, trabalhosos, imprecisos, não reproduzíveis, consomem tempo, podem dar um resultado ambíguo e não podem ser realizados em qualquer laboratório (HUARD *et al.*, 2003).

Métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase, oferecem uma alternativa interessante para a classificação e identificação dessas bactérias, sendo um método rápido e preciso (ARAÚJO *et al.*, 2005; HUARD *et al.*, 2006; MURAKAMI, *et al.*, 2006). Os passos mais limitantes são as extrações de DNA genômico amplificável de qualidade e a disponibilidade de oligonucleotídeos com alta especificidade para diferentes espécies (KHAN e YADAV, 2004). Isso torna difícil estimar com precisão a proporção de casos de tuberculose humana causada por infecção por *M. bovis*, particularmente em países em desenvolvimento, onde métodos de diagnóstico para diferenciação de espécies ainda não estão bem estabelecidos (RUA-DOMENECH, 2006) na maioria dos laboratórios.

## 1.8. CONTROLE

A tuberculose bovina pode ser controlada em um país ou uma região pela implantação de uma política de teste e sacrifício, se não existirem outros hospedeiros reservatórios para manter a infecção no local (COSIVI *et al.*, 1998). Apesar de diversos estudos sobre vacinação e tratamento da tuberculose bovina, até o presente, os resultados obtidos não justificam a adoção dessas medidas como forma de controle da enfermidade (BRASIL, 2006). Embora normalmente não considerada relevante para programas de eliminação nos animais de produção, a vacinação de animais contra tuberculose seria uma estratégia viável em animais domésticos e em animais silvestres que podem ser reservatórios da doença em países endêmicos (COSIVI *et al.*, 1998). Além disso, recentes avanços na tecnologia das vacinas contra tuberculose podem tornar a medida viável para produções de bovinos em um futuro próximo (VORDERMEIER *et al.*, 2006).

Como medida de controle da transmissão de *M. bovis* para seres humanos, a inspeção sanitária dos produtos de origem animal destinados ao consumo humano e a pasteurização ou esterilização do leite e derivados diminuem os riscos de transmissão de *M. bovis* para as pessoas (HUGH-JONES *et al.*, 1995). Além disso, é importante que a saúde dos trabalhadores das propriedades rurais seja rotineiramente monitorada. Ações de restrição de contato com possíveis

reservatórios domésticos ou silvestres também devem ser consideradas (BRASIL, 2006).

Embora em países desenvolvidos a pasteurização e programas de erradicação de rebanhos positivos para tuberculização tenham reduzido a incidência de doenças humanas e bovinas causadas por *M. bovis*, o controle da tuberculose bovina e programas de erradicação foram implantados apenas recentemente no Brasil. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose humana foi implantado em 1996 no Brasil e tem por objetivo realizar o tratamento supervisionado dos pacientes, para diminuir a taxa de abandono, evitar o surgimento de bacilos resistentes e possibilitar um efetivo controle da tuberculose humana no país (BRASIL, 2002). Do mesmo modo, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído apenas em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde comunitária, pela redução da prevalência e da incidência de novos casos. Além disso, o projeto visa promover também a competitividade da pecuária nacional, criando um número significativo de propriedades certificadas que oferecem ao consumidor produtos de baixo risco sanitário. O PNCEBT definiu uma estratégia de diagnóstico para essas doenças e a certificação de propriedades livres onde essas enfermidades serão controladas com grande rigor (BRASIL, 2006).

## 1.9. CONCLUSÃO

A tuberculose causada por *M. bovis* apresenta grande importância para saúde pública, saúde animal e produção animal. Mesmo com a necessidade de muitos estudos futuros, a ressurgência do interesse científico na tuberculose nos anos recentes, devido à necessidade de desenvolvimento de métodos mais eficazes de diagnóstico, prevenção, controle e erradicação da tuberculose bovina, têm esclarecido lacunas significantes na compreensão da patogenia e epidemiologia da doença. A implantação de programas de controle e erradicação eficazes é de extrema importância para reduzir a prevalência e a incidência da doença, em países

onde a tuberculose é disseminada como no Brasil, e ainda para reduzir os riscos de transmissão de animais para seres humanos.

#### 1.10. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**. v. 1. Bacterioses and Mycoses. 3. ed. Washington D. C.: Pan American Health Organization, 2003, 384 p.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 593-623, 1999.

ARAÚJO, C. P.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K. A.; JORGE, K. S. G.; OSÓRIO, A. L. A. R. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from *post-mortem* inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 749-752, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Tuberculose – guia de vigilância epidemiológica**. Comitê Técnico – Científico de Assessoramento à Tuberculose e Comitê Assessor para Co-infecção HIV-Tuberculose. – Brasília: MS/FUNASA, 2002. 100 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

BRENNAN, P. J.; NIKAIKO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**. v. 64, p. 29-63, 1995.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684–3689, 2002.

CASSIDY, J. P. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 151-161, 2006.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMAYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998.

CREVEL, R. V.; OTTENHOFF, T. H. M.; MEER, J. W. M. V. D. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 294-309, 2002.

DAFFE, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Advances in Microbial Physiology**, v. 39, p. 131-203, 1998.

DUNGWORTH, D. L. The Respiratory System. In: JUBB, K. V. F. **Pathology of Domestic Animals**. London: Kennedy and N.C. Palmer, Academic Press, 1993, p. 641-652.

GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**, v. 81, p. 71-77, 2001.

HUARD, R. C.; LAZZARINI, L. C. O.; BUTLER, W. R.; SOOLINGEN, D.; HO, J. L. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1637-1650, 2003.

HUARD, R. C.; FABRE, M.; HAAS, P.; LAZZARINI, L. C. O.; SOOLINGEN, D. V.; COUSINS, D.; HO, J. L. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 12, p. 4271-4287, 2006.

HUCHZERMEYER, H. F. K. A.; BRÜCKNER, G. K.; VAN HEERDEN, A.; KLEEBERG, H. H.; VAN RENSBURG, I. B. J.; KOEN, P.; LOVEDAY, R. K. Tuberculosis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**. v. 2. United Kingdom: Oxford University Press, 1994, p. 1425-1444.

HUGH-JONES, M. E.; HUBBERT, W. T.; HAGSTAD, H. V. **Zoonosis: Recognition, Control, and Prevention**. 1. ed. Ames, Iowa: Iowa State Press. A Blackwekk Publishing Company, 1995. 369 p.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Veterinary Pathology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1997. 1415 p.

KHAN, I. U. H.; YADAV, J. S. Development of a single-tube, cell lysis-based, genus-specific PCR method for rapid identification of Mycobacteria: optimization of cell lysis, PCR primers and conditions, and restriction pattern analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 424, p. 53-457, 2004.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

MATTHIAS, D. Infecções por Micobactérias. In: BEER, J. **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1988, p. 261-289.

MATTOS, I. G.; RIBEIRO, M. O.; NETTO, I. C. O.; AZEVEDO, P. A. Tuberculosis: A study of 111 cases in an area of high prevalence in the extreme south of Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 194-198, 2006.

MEDINA, E.; RYAN, L.; LACOURSE, R.; NORTH, R. J. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. **Tuberculosis**, v. 86, p. 20–27, 2006.

MURAKAMI, P. S.; BIESDORF, S. M.; BROCKELT, S. R.; NAKATANI, S. M.; RIEDIGER, I. N.; FUVERKI, R. B. N.; BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W. Uso do PCR no Diagnóstico *Post-mortem* de *Mycobacterium spp* em Bovinos. **Revista Higiene Alimentar**. Edição Especial. II Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses. v. 21, n. 150, p. 396-397, 2007.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 41-52, 1994.

NEILL, S. D.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, v. 81, p. 79-86, 2001.

NEILL, S. D.; SKUCE, R. A. POLLOCK, J. M. Tuberculosis – new light from an old window. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1261–1269, 2005.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, Supplement 1, p. 1-46, 1995.

OCEPEK, M.; PATE, M.; ZOLNIR-DOVC, M.; POLJAK, M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from Human to Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3555–3557, 2005.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 181-190, 2006.

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P.; CHI, K. D. Isolation of *Mycobacterium spp.* in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **Veterinary Journal**, v. 163, p. 115–127, 2002.

RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, p. 77–109, 2006.

SALYERS, A. A.; DIXIE, D. W. **Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach**. 2. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2002. 600 p.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 175-178, 1993.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p.

VORDERMEIER, H. M.; CHAMBERS, M. A.; BUDDLE, B. M.; POLLOCK, J. M.; HEWINSON, R. G. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 229–244, 2006.

## **2. CAPÍTULO 2 - INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* E *Mycobacterium tuberculosis* EM MAMÍFEROS SILVESTRES**

(Artigo a ser submetido para publicação para a Revista Clínica Veterinária)

### **RESUMO**

A tuberculose nos animais silvestres é causada principalmente por *Mycobacterium bovis*, que apresenta uma ampla variedade de hospedeiros, e por *Mycobacterium tuberculosis*, que causa doença em animais que estão em contato próximo com seres humanos infectados. Mundialmente, espécies de primatas, carnívoros, ungulados, marsupiais e roedores são afetados pela tuberculose. Apesar da grande diversidade de mamíferos silvestres no Brasil, as informações sobre a doença nesses animais ainda são escassas. As principais formas de transmissão da tuberculose são pela inalação de aerossóis e ingestão de alimentos contaminados. Em geral, os achados clínicos apresentam-se cronicamente como granulomas em diversos órgãos, causando tosse, dispnéia, perda de peso e letargia. Mesmo face à ausência de padrões de referência para muitas espécies, a detecção do agente é realizada principalmente pela tuberculinização e por exames bacteriológicos, histopatológicos e moleculares. O controle da tuberculose nos mamíferos silvestres é limitado pela falta de ferramentas de diagnóstico e pela inexistência de uma vacina eficaz. O aumento da interação entre as populações humana e silvestre, devido à expansão da população humana e destruição de habitats, alerta para a importância na compreensão da tuberculose em mamíferos silvestres, tanto para saúde animal quanto para saúde pública.

**PALAVRAS-CHAVE:** animais silvestres, controle, diagnóstico, tuberculose.

## ABSTRACT

Tuberculosis in wildlife animals is mainly caused by *Mycobacterium bovis*, which presents a wide variety of hosts, and by *Mycobacterium tuberculosis*, which causes the disease in animals that are in close contact with infected human beings. Throughout the world, species of primates, carnivorous, ungulates, marsupials and rodents are affected by tuberculosis. Despite the wide diversity of wild mammals in Brazil, the information about the disease in these animals is still scarce. The main transmission forms are by aerosol inhalation and ingestion of contaminated food. In general, clinical findings are chronically presented as granulomas in several organs, causing coughing, dyspnea, weight loss, and letargy. Even face to the absence of reference standards for several species, agent detection is mainly performed by tuberculin skin test and bacteriological, histopathological and molecular exams. Tuberculosis control in wild mammals is limited by the lack of diagnostic tools and by the absence of an effective vaccine. The increasing interaction between human and wildlife populations, due to the spreading of human population and destruction of habitats, alerts to the importance of tuberculosis comprehension in wild mammals, for both animal health and public health.

KEY-WORDS: wildlife animals, control, diagnosis, tuberculosis.

## 2.1. INTRODUÇÃO

O Brasil abriga a maior diversidade de mamíferos do mundo, com mais de 530 espécies descritas, sendo que mais de 60 dessas espécies estão ameaçadas de extinção (COSTA *et al.*, 2005). Entretanto, são poucos os estudos de doenças nesses animais, em particular das zoonoses. Enfermidades tais como a tuberculose, são de importância em medicina de animais silvestres devido ao potencial combinado de causar doença clínica em uma espécie, predispor a ocorrência de doença crônica e suas seqüelas nesta população, e ainda apresentar potencial de transmissão para animais domésticos e seres humanos (ISAZA, 2003). A tuberculose apresenta ainda importância em animais silvestres de cativeiro, devido à dificuldade em repor indivíduos raros ou em risco de extinção, e dificulta ainda mais a sobrevivência das espécies ameaçadas em vida livre (THOEN, 1993).

Os principais agentes etiológicos da tuberculose em mamíferos silvestres são *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*, microrganismos relacionados do Complexo *M. tuberculosis* (MICHALAK *et al.*, 1998). A infecção por *M. bovis* tem sido extensamente documentada em uma ampla variedade de animais silvestres, tanto em populações de vida livre como de cativeiro (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994; PALMER *et al.*, 2002). Em contraste, *M. tuberculosis* é considerado um patógeno primariamente humano, e tem sido descrito apenas em espécies domésticas ou silvestres que vivem em contato próximo e prolongado com seres humanos (ALEXANDER *et al.*, 2002; ACHA e SZYFRES, 2003).

Apesar da importância em saúde animal e saúde pública, são poucos os trabalhos de tuberculose em animais silvestres no Brasil. Deste modo, o presente estudo teve por objetivo uma revisão bibliográfica mundial da tuberculose em mamíferos silvestres, abordando epidemiologia, fatores de risco, transmissão, achados clínicos, diagnóstico, controle da doença e suas implicações na saúde pública e saúde de animais domésticos.

## 2.2. EPIDEMIOLOGIA

### 2.2.1. No Mundo

Todos os mamíferos apresentam potencial risco de adquirir a infecção, desde que entrem em contato com hospedeiros infectados ou com suas secreções e excreções (BENGIS, 1999). Existem relatos de casos de tuberculose em diversas espécies de animais silvestres no mundo inteiro, tanto de vida livre como de cativeiro (PAGE, 1976).

Nas Américas (TABELA 1), existem descrições da doença nos Estados Unidos da América, causada por *M. tuberculosis* em elefantes (*Elephas sp.*) e rinocerontes (*Diceros bicornis*) de fazendas e zoológicos (MICHALAK *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2002). Já a tuberculose bovina foi descrita naquele país, em cervos (*Odocoileus virginianus*), coiotes (*Canis latrans*), guaxinins (*Procyon lotor*), raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), ursos-negros (*Ursus americanus*) e lincos-vermelhos (*Lynx rufus*) de vida livre (SCHMITT *et al.*, 1997; BRUNING-FANN *et al.*, 2001).

Na Europa (TABELA 2), foram registrados casos de tuberculose bovina em cervos vermelhos (*Cervus elaphus*), javalis (*Sus scrofa*), raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) e lincos ibéricos (*Lynx pardina*) de vida livre na Espanha (BRIONES *et al.*, 2000; GORTAZAR *et al.*, 2005; MARTÍN-ATANCE *et al.*, 2005). Na Inglaterra e Irlanda do Norte, existem várias descrições de *M. bovis* em cervídeos (*Cervus sp.*, *Capreolus sp.*, *Dama sp.*), lhamas (*Llama glama*), gambás (*Trichosurus vulpecula*), toupeiras (*Talpa europaea*), ratos silvestres (*Rattus norvegicus*), texugos (*Meles meles*), mustelídeos (*Mustela furo*, *Mustela vison*), raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) e gatos silvestres (*Felis catus*) de vida livre (DELAHAY *et al.*, 2001; TWOMEY *et al.*, 2007). Em zoológicos da Suécia, microrganismos do Complexo *M. tuberculosis* foram descritos em sagüis-de-cabeça-branca (*Saguinus oedipus*), antas brasileiras (*Tapirus terrestris*), elefantes asiáticos (*Elephas maximus*) e girafas (*Giraffa camelopardalis*) (STERNBERG *et al.*, 2002; LEWERIN *et al.*, 2005).

Na África (TABELA 3), a espécie *M. tuberculosis* já foi relatada em manguços-lustrados (*Mungos mungo*) e suricates (*Suricata suricatta*) de vida livre (ALEXANDER *et al.*, 2002). Ainda, em zoológicos da África do Sul, foram descritos casos de *M.*

*tuberculosis* em antas brasileiras (*Tapirus terrestris*), antas malaias (*Tapirus indicus*), primatas (*Papio ursinus*, *Pan troglodytes*, *Semnopithecus entellus*), antílopes (*Tragelaphus imberbis*, *Redunca fulvorufula*) (MICHEL *et al.*, 2003). Já na Zâmbia, Uganda e Tanzânia, infecção por *M. bovis* foi relatada em antílopes (*Kobus leche*), javalis africanos (*Phacochoerus aethiopicus*) e leões (*Panthera leo*) de vida livre (CLANCEY, 1977; WOODFORD, 1982; CLEAVELAND *et al.*, 2005).

A tuberculose também tem sido descrita em países da Oceania, como na Nova Zelândia, onde mustelídeos (*Mustela sp.*), gambás (*Trichosurus vulpecula*), ouriços (*Erinaceus europaeus*), coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), e cervídeos (*Cervus sp.*) são comumente infectados (COLEMAN e COOKE, 2001).

### 2.2.2. No Brasil

O Brasil possui atualmente 44 espécies de mamíferos nativos da ordem Didelphimorphia, 83 espécies da ordem Primates, 32 espécies da ordem Carnivora, 1 espécie da ordem Perissodactyla, 8 espécies da ordem Artiodactyla, 165 espécies da ordem Rodentia e 1 espécie da ordem Lagomorpha (COSTA *et al.*, 2005).

Embora a tuberculose tenha sido descrita em outros países do mundo, em vários mamíferos silvestres que existem em cativeiro ou vida livre, incluindo antas brasileiras (STERNBERG *et al.*, 2002; MICHEL *et al.*, 2003), no Brasil apenas recentemente foram diagnosticadas infecções por *M. tuberculosis* em antas brasileiras de zoológico do Estado do Paraná (MURAKAMI *et al.*, 2007). Não há relatos conhecidos de outra descrição de diagnóstico definitivo de tuberculose em espécies silvestres em território nacional (TABELA 1).

O Brasil é ainda o país com a maior diversidade de espécies de primatas em todo o mundo, com mais de 80 espécies no território nacional (COSTA *et al.*, 2005). Embora primatas sejam tão susceptíveis a *M. tuberculosis* quanto a *M. bovis*, e infecções por *M. tuberculosis* nesses animais da América do Sul seja relativamente pequena (BEYNON e COOPER, 1991), quase 70% dos isolados desses animais no mundo são provenientes de cepas do bacilo humano (ACHA e SZYFRES, 2003). No

entanto, como já mencionado, não há referência da infecção em primatas no território nacional.

No único estudo encontrado no Brasil da tuberculose em animais silvestres, feito no Estado do Mato Grosso do Sul, todos os 53 cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de vida livre pesquisados foram negativos para tuberculose (LUNA *et al.*, 2003). A tuberculose bovina é um importante problema em cervídeos criados em fazendas de todo o mundo para caça e alimentação, sendo o contato com bovinos e alimentação contaminada as causas mais freqüentes de infecção (ACHA e SZYFRES, 2003; NISHI *et al.*, 2006). Deste modo, com oito espécies nativas da ordem Artiodactyla no Brasil, parte delas convivendo em outras áreas de criação extensiva de bovinos, esse resultado negativo pode não refletir a situação nacional. Como a prevalência da tuberculose bovina continua aumentando, há também um grande risco de disseminação para outras espécies susceptíveis (MICHEL *et al.*, 2006). Em países como o Brasil, onde a tuberculose é endêmica em bovinos, há a possibilidade de que muitas espécies silvestres estejam infectadas ou venham a se infectar com o agente.

**TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA TUBERCULOSE (*Mycobacterium tuberculosis* E *Mycobacterium bovis*) NOS PRINCIPAIS MAMÍFEROS SILVESTRES, NAS AMÉRICAS.**

Local	Mamífero estudado	<i>Mycobacterium</i> identificado	Método de diagnóstico	Origem	Possível transmissão	Lesões	Referência
EUA (Michigan)	Cervo ( <i>Odocoileus virginianus</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo Molecular	Vida livre (caça)	Alta densidade populacional	Lesões sugestivas	SCHMITT <i>et al.</i> , 1997
EUA (Michigan)	Coiote ( <i>Canis latrans</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo Molecular	Vida livre	Consumo de cervos infectados	Sem lesões	BRUNING-FANN <i>et al.</i> , 1998
EUA (Michigan)	Guaxinim ( <i>Procyon lotor</i> ), Raposa vermelha ( <i>Vulpes vulpes</i> ), Urso-negro ( <i>Ursus americanus</i> ), Lince-vermelho ( <i>Lynx rufus</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo	Vida livre	Consumo de cervos infectados	Lesões sugestivas	BRUNING-FANN <i>et al.</i> , 2001
EUA (Illinois)	Elefante ( <i>Elephas sp.</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Fazenda	Desconhecida Contato com seres humanos	Lesões sugestivas	MICHALAK <i>et al.</i> , 1998
EUA (Califórnia)	Elefante asiático ( <i>Elephas maximus</i> ), Rinoceronte ( <i>Diceros bicornis</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Cativeiro (Zoológico)	Contato com seres humanos	Lesões sugestivas	OH <i>et al.</i> , 2002
Brasil (Mato Grosso do Sul)	Cervo ( <i>Blastocerus dichotomus</i> )	Negativo	Molecular	Vida livre	_____	_____	LUNA <i>et al.</i> , 2003
Brasil (Paraná)	Antas ( <i>Tapirus terrestris</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Cativeiro (Zoológico)	Contato com seres humanos	Lesões sugestivas	BIAVA <i>et al.</i> , 2007; MURAKAMI <i>et al.</i> , 2007

**TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DA TUBERCULOSE (*Mycobacterium tuberculosis* E *Mycobacterium bovis*) NOS PRINCIPAIS MAMÍFEROS SILVESTRES, NA EUROPA.**

Local	Mamífero estudado	<i>Mycobacterium</i> identificado	Método de diagnóstico	Origem	Possível transmissão	Lesões	Referência
Espanha	Cervo vermelho ( <i>Cervus elaphus</i> )	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Vida livre (caça)	Contato com bovinos	_____	GORTAZAR <i>et al.</i> , 2005
Espanha	Javali ( <i>Sus scrofa</i> )	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Vida livre (caça)	Contato com bovinos	_____	GORTAZAR <i>et al.</i> , 2005
Espanha	Raposa vermelha ( <i>Vulpes vulpes</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo	Vida livre	Contato com bovinos	Sem lesões	MARTÍN-ATANCE <i>et al.</i> , 2005
Espanha	Lince-ibérico ( <i>Lynx pardina</i> )	<i>M. bovis</i>	Bacilosopia Cultivo Molecular	Vida livre	Ingestão de animais infectados	Lesões sugestivas	BRIONES <i>et al.</i> , 2000
Inglaterra e Irlanda do Norte	Cervídeos ( <i>Cervus sp.</i> , <i>Capreolus sp.</i> , <i>Dama sp.</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo	Vida livre	Contato com bovinos	_____	DELAHAY <i>et al.</i> , 2001
Inglaterra e Irlanda do Norte	Gambá ( <i>Trichosurus vulpecula</i> ), Toupeira ( <i>Talpa europaea</i> ) e Rato silvestre ( <i>Rattus norvegicus</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo	Vida livre	Contato com bovinos	_____	DELAHAY <i>et al.</i> , 2001
Inglaterra e Irlanda do Norte	Texugo ( <i>Meles meles</i> ), Mustelídeos ( <i>Mustela furo</i> , <i>Mustela vison</i> ), Raposa vermelha ( <i>Vulpes vulpes</i> ) e Gato Silvestre ( <i>Felis catus</i> )	<i>M. bovis</i>	Tuberculinização Bacilosopia Cultivo Outros	Fazenda	_____	Lesões sugestivas	TWOMEY <i>et al.</i> , 2007
Inglaterra	Lhama ( <i>Llama glama</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo	Vida livre	Contato com bovinos	_____	TWOMEY <i>et al.</i> , 2007
Suécia	Sagüi-de-cabeça-branca ( <i>Saguinus oedipus</i> )	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	Tuberculinização	Cativeiro (Zoológico)	_____	_____	STERNBERG <i>et al.</i> , 2002
Suécia	Anta brasileira ( <i>Tapirus terrestris</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Tuberculinização Cultivo	Cativeiro (Zoológico)	_____	_____	STERNBERG <i>et al.</i> , 2002;
Suécia	Elefante asiático ( <i>Elephas maximus</i> ), Girafa ( <i>Giraffa camelopardalis</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Tuberculinização Molecular Cultivo	Cativeiro (Zoológico)	Contato com seres humanos Contato com outros animais infectados	Sem lesões e com lesões sugestivas	LEWERIN <i>et al.</i> , 2005

**TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DA TUBERCULOSE (*Mycobacterium tuberculosis* E *Mycobacterium bovis*) NOS PRINCIPAIS MAMÍFEROS SILVESTRES, NA ÁFRICA.**

Local	Mamífero estudado	<i>Mycobacterium</i> identificado	Método de diagnóstico	Origem	Possível transmissão	Lesões	Referência
Zâmbia	Antílope ( <i>Kobus leche</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo	Vida livre (caça)		Sem lesões e com lesões sugestivas	CLANCEY, 1977
Uganda	Javali africano ( <i>Phacochoerus aethiopicus</i> )	<i>M. bovis</i>	Cultivo	Vida livre	Alimentos contaminados	Com lesões sugestivas	WOODFORD, 1982
África do Sul e Botsuana	Manguço-listrado ( <i>Mungos mungo</i> ) Suricates ( <i>Suricata suricatta</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Vida livre	Contato com seres humanos	Lesões sugestivas	ALEXANDER <i>et al.</i> , 2002
África do Sul	Anta brasileira ( <i>Tapirus terrestris</i> ), Anta malaia ( <i>Tapirus indicus</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Cativeiro (Zoológico)	Alimentos contaminados Contato com seres humanos	Lesões sugestivas	MICHEL <i>et al.</i> , 2003
África do Sul	Primatas ( <i>Papio ursinus</i> , <i>Pan troglodytes</i> , <i>Semnopithecus entellus</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Cativeiro (Zoológico)	Entre animais Alimentos contaminados Contato com seres humanos	Lesões sugestivas	MICHEL <i>et al.</i> , 2003
África do Sul	Antílopes ( <i>Tragelaphus imberbis</i> , <i>Redunca fulvorufula</i> )	<i>M. tuberculosis</i>	Cultivo Molecular	Cativeiro (Zoológico)	Alimentos contaminados Contato com seres humanos	Lesões sugestivas	MICHEL <i>et al.</i> , 2003
Tanzania	Leão ( <i>Panthera leo</i> )	<i>M. bovis</i>	Outros	Vida livre	Consumo de presas infectadas	Sem lesões e com lesões sugestivas	CLEAVELAND <i>et al.</i> , 2005

### 2.3. FATORES DE RISCO

A incidência de tuberculose tem aumentado no mundo inteiro, com a maioria dos casos nos países em desenvolvimento (ALEXANDER *et al.*, 2002). Aspectos ecológicos, ambientais, e demográficos influenciam a emergência da doença. Animais silvestres de vida livre, que vivem distante da população humana, geralmente apresentam baixos índices de tuberculose (ACHA e SZYFRES, 2003; MICHEL *et al.*, 2003). No entanto, a proximidade geográfica entre pessoas e animais domésticos ou silvestres, resultantes da expansão humana em áreas remotas e do aumento da mobilidade global dos seres humanos e animais de comércio, fornece novas oportunidades para transmissão da doença entre essas espécies (O'BRIEN *et al.*, 2004). Além disso, a expansão do ecoturismo e alterações nas práticas de uso das terras também podem ter levado a um aumento da carga de *M. tuberculosis* disseminada no ambiente (ALEXANDER *et al.*, 2002; MICHEL *et al.*, 2006).

Animais de vida livre normalmente não apresentam infecção por *M. tuberculosis*. O primeiro relato de infecção por essa espécie em vida livre foi feito em manguços-listrados (*Mungos mungo*) e em suricates (*Suricata suricatta*) da África. Esses animais habitavam próximos à civilização humana, com acesso a secreções e excreções de indivíduos infectados (ALEXANDER *et al.*, 2002). No Brasil, além da perda e fragmentação do habitat, provavelmente as doenças humanas são as maiores preocupações para a conservação de animais como primatas na Mata Atlântica (COSTA *et al.*, 2005). Já populações silvestres em cativeiro como zoológicos e laboratórios podem apresentar uma alta taxa de prevalência, por estarem mais expostos à infecção (ALEXANDER *et al.*, 2002; MICHEL *et al.*, 2003). O mesmo ocorre com outros animais silvestres, como cervídeos, criados para a caça ou alimentação (GORTAZAR *et al.*, 2005; CHOMEL *et al.*, 2007). Além disso, em cativeiro esses animais podem viver sob intenso estresse, alta densidade populacional e condições inadequadas de nutrição e higiene, tornando-os mais suscetíveis a infecções. Em relação ao microrganismo, *M. tuberculosis* pode sobreviver durante semanas ou meses em escarro expelido úmido ou seco protegido da luz solar, enquanto que *M. bovis* pode sobreviver por seis meses no solo, em misturas de solo e fezes e em fezes, e por 49 dias em gramados (HUCHZERMEYER

*et al.*, 1994). Dessa forma, contato íntimo, áreas comuns para alimentação e fornecimento de água de beber, dificuldade em desinfetar adequadamente áreas externas e a exposição aos visitantes favorecem a manutenção e a sobrevivência do agente da tuberculose, particularmente em locais de cativeiro (MICHEL *et al.*, 2003).

#### 2.4. TRANSMISSÃO

Mesmo entre as espécies nas quais a tuberculose ocorre amplamente, há variações e incertezas sobre a habilidade em manter a doença dentro de suas próprias populações (COLEMAN e COOKE, 2001). A incidência da tuberculose depende de densidade populacional, estruturas sociais, alimentação, comportamento e hábitos territoriais. Em espécies com hábitos gregários como antílopes e cervídeos, casos de tuberculose bovina tornam-se endêmicos na população. Pequenos mamíferos não-ungulados, menos gregários de média a alta densidade, como marsupiais e mustelídeos, também parecem ser capazes de manter a infecção em suas populações e se tornarem hospedeiros reservatórios (BENGIS, 1999). As principais rotas de transmissão de *M. bovis* são inalação e ingestão, com inoculação por lesões e transmissão congênita possíveis, mas raras (O'BRIEN *et al.*, 2004). Cervídeos transmitem a doença por secreção nasal, saliva ou ocasionalmente por alimento contaminado. A superpopulação de cervídeos em locais de alimentação ou em coleções de cativeiro pode propiciar uma oportunidade para transmissão por aerossóis (ISAZA, 2003). A disseminação de micobactérias entre javalis parece ocorrer pela saliva, mesmo em animais com lesões restritas aos linfonodos mandibulares. Na Espanha, o isolamento de cepas de tuberculose em propriedades cercadas de animais silvestres que não tiveram contato com animais domésticos por no mínimo duas décadas, sugere fortemente que microrganismos do complexo *M. tuberculosis* conseguem sobreviver nessas populações (GORTAZAR *et al.*, 2005).

Em contraste, é apenas parcialmente compreendida a fonte de infecção em predadores solitários e outros carnívoros (MICHEL *et al.*, 2006). Animais como leões e guepardos (*Acinonyx jubatus*) parecem tornar-se infectados acidentalmente e há uma chance limitada da doença persistir na população sem uma fonte externa de

reinfecção (BENGIS, 1999). A infecção acidental pode ocorrer pela ingestão de carne contaminada (ISAZA, 2003) ou pelo contato com carcaças infectadas (BRUNING-FANN *et al.*, 2001; PALMER *et al.*, 2002). Os carnívoros no Brasil, como a onça-pintada (*Panthera onca*) e a onça-parda (*Puma concolor*), as quais freqüentemente atacam os rebanhos, particularmente na região do Pantanal (COSTA *et al.*, 2005), podem infectar-se pelo agente da tuberculose por contato com populações de bovinos que apresentam a doença de forma endêmica.

Seres humanos têm sido considerados a fonte de infecção para casos de doença por *M. tuberculosis* em animais silvestres (MICHALAK *et al.*, 1998), o que é uma grande preocupação principalmente em zoológicos, onde o contato entre animais e pessoas pode ser constante (ISAZA, 2003). Em doze casos de infecção por *M. tuberculosis* no Jardim Zoológico Nacional da África do Sul, muitos dos animais que se contaminaram não dividiam o recinto com outros animais infectados. Além disso, a heterogeneidade encontrada entre as cepas, reforça a idéia de que a infecção ocorreu por múltiplas fontes externas, como o contato e o fornecimento de alimentos contaminados pelo público visitante (MICHEL *et al.*, 2003). Entre animais silvestres de cativeiro, os primatas recebem atenção especial devido a sua susceptibilidade a *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Eles contraem a infecção via respiratória ou digestiva. A infecção pode ser propagada entre os primatas e constitui um grave problema para colônias mantidas em instituições científicas ou zoológicos (ACHA e SZYFRES, 2003).

## 2.5. ACHADOS CLÍNICOS

O tipo da doença produzida por micobactérias patogênicas varia para as diferentes espécies animais e depende da dose infectante, da virulência da cepa infectante e da susceptibilidade dos hospedeiros (THOEN, 1993). Em zoológicos e outros locais que mantêm animais silvestres em cativeiro, freqüentemente sinais vagos e não específicos da tuberculose podem passar despercebidos em mamíferos que não são facilmente manejáveis (STERNBERG *et al.*, 2002). O diagnóstico clínico da tuberculose normalmente só é possível após um estágio avançado da doença. Os sinais exibidos dependem da extensão e da localização das lesões. O

aumento superficial dos linfonodos promove um sinal diagnóstico útil; entretanto, lesões localizadas em linfonodos profundos são de pouco ou nenhum valor para estabelecer um diagnóstico clínico. Os sinais gerais são fraqueza, anorexia, dispnéia, tosse, emagrecimento e febre baixa flutuante (PACHALY, 1992; THOEN, 1993).

Em primatas, a infecção por *M. tuberculosis* tem um curso de seis meses ou mais (BEYNON e COOPER, 1991). Sinais clínicos e lesões associadas com *M. bovis* em primatas são indistinguíveis de *M. tuberculosis* (ISAZA, 2003). As lesões de necropsia nos animais susceptíveis são caracterizadas por granulomas no parênquima do pulmão e linfonodos associados da cavidade torácica e acentuada linfadenopatia bronquial (THOEN, 1993). Lesões de tuberculose são encontradas mais comumente nos pulmões, fígado e baço (BEYNON e COOPER, 1991). Histologicamente as lesões podem ser cavitárias com caseação central. Diferentemente dos seres humanos, as lesões nos primatas não humanos contém poucas células gigantes de Langhans e calcificação mínima. Ocasionalmente, em infecções severas, um padrão miliar disseminado pode ser visto ao longo do tecido pulmonar (ISAZA, 2003).

Em cervídeos linfadenite nos linfonodos retrofaríngeos e granulomas pulmonares são as lesões mais comuns de *M. bovis* (ISAZA, 2003). Em animais desta espécie estudados em Michigan, EUA, lesões craniais foram notadas mais freqüentemente nos linfonodos retrofaringeais mediais, embora também tenham sido encontradas nos linfonodos parotídeos. Lesões extracraniais ocorreram mais comumente no tórax. Outros sítios como fígado, baço, rúmen e glândula mamária também foram afetados (O'BRIEN *et al.*, 2001).

## 2.6. SAÚDE PÚBLICA

A tuberculose em espécies silvestres apresenta interesse em saúde pública, com transmissão ocorrendo entre animais e seres humanos (ISAZA, 2003). A suscetibilidade de seres humanos a *M. bovis*, leva a uma preocupação com relação aos riscos potenciais que funcionários de locais com animais em cativeiro podem enfrentar em suas atividades ocupacionais (O'BRIEN *et al.*, 2004). O risco de

transmissão zoonótica é maior para os tratadores que lidam diariamente com os animais, do para pessoas com breve contato, como visitantes das atrações ou exposições (MICHALAK *et al.*, 1998; CHOMEL *et al.*, 2007). Pessoas que estão em contato com animais silvestres devido a atividades de caça também apresentam potencial risco para infecção (ACHA e SZYFRES, 2003). Os zoológicos podem agir como reservatórios da doença nos países desenvolvidos, nos quais a tuberculose tenha sido controlada em populações humanas e animais. Por outro lado, em países em desenvolvimento, com altas taxas de incidência tanto de tuberculose humana como de tuberculose bovina, particularmente em indivíduos imunocomprometidos, (MICHEL *et al.*, 2003; O'BRIEN *et al.*, 2004), a infecção em animais de zoológicos pode prejudicar o controle da doença.

Embora evidências de transmissão de *M. tuberculosis* de pessoas para animais tenham sido descritas, existe pouca documentação de transmissão zoonótica para seres humanos (OH *et al.*, 2002). Apenas um relato de transmissão de *M. tuberculosis* de elefantes para seres humanos, em Illinois nos EUA foi encontrado. Os possíveis mecanismos de transmissão considerados foram contato próximo durante manejo e treinamento, limpeza dos recintos, participação em necropsias e habitação próxima aos recintos (MICHALAK *et al.*, 1998).

## 2.7. SAÚDE DE ANIMAIS DOMÉSTICOS

Rebanhos bovinos das fazendas podem entrar em contato com populações silvestres de vida livre através de danos nas cercas ou invasão de animais silvestres menores (MICHEL *et al.*, 2006). Uma vez que o agente é introduzido entre os animais silvestres que dividem o pasto com os bovinos, pode haver a disseminação da doença na nova espécie (CHOMEL *et al.*, 2007). Em populações bovinas de países desenvolvidos, que tiveram a doença controlada, a existência de reservatórios silvestres representa a possibilidade de retransmissão da infecção (ACHA e SZYFRES, 2003). A transmissão de *M. bovis* de mamíferos silvestres para os bovinos existe, como demonstrado na Nova Zelândia, Inglaterra e América do Norte (MICHEL *et al.*, 2006). Além disso, em países onde programas de controle e erradicação da doença foram implantados apenas recentemente, como no Brasil

(BRASIL, 2006), a eliminação da tuberculose pode ser prejudicada, pois animais silvestres de vida livre podem agir como vetores da doença para os animais domésticos (COLEMAN e COOKE, 2001; O'BRIEN *et al.*, 2004).

## 2.8. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de tuberculose para mamíferos silvestres apresenta importância em saúde pública, saúde animal e economia mundial. No entanto, não é simples realizar essa identificação. Muitas vezes, a técnica utilizada comumente para animais domésticos ou para seres humanos não pode ser utilizada para animais silvestres. Além disso, para algumas espécies animais não existem testes *ante-mortem* disponíveis até o presente e o diagnóstico depende apenas de cultura e histopatologia (MICHEL *et al.*, 2006).

A sintomatologia clínica dos animais, como tosse crônica ou perda de peso (BEYNON e COOPER, 1991), e a radiografia de tórax, (ACHA e SZYFRES, 2003), podem indicar a suspeita da doença, mas não são métodos definitivos. O diagnóstico da tuberculose nos mamíferos silvestres freqüentemente é baseado nos resultados de hipersensibilidade do tipo tardia, em resposta à tuberculinização intradérmica com utilização de derivados protéicos purificados (PPD). Segundo estudos em zoológicos suecos, sugere-se que 0,1 mL de PPD bovina e aviária seja utilizada com leitura dos resultados em 72 horas por observação visual e palpação para edema característico. Em mamíferos de grande porte a tuberculina é geralmente aplicada em uma prega de pele próxima à base da cauda ou na região cervical. Outros locais incluem a pálpebra para primatas, a pele axilar para camelídeos e a pele da base da orelha para suídeos. Somente um local deve ser utilizado em cada ocasião, embora cada tipo de PPD deva ser inoculado distanciadamente de qualquer outro local de injeção (THOEN, 1993; STERNBERG *et al.*, 2002). O teste tuberculínico apresenta uma série de desvantagens, que incluem o tempo de espera para a verificação do resultado e a necessidade do veterinário visitar os animais duas vezes (ACHA e SZYFRES, 2003). Também não há padrões de referência para interpretação dos resultados. Os locais de administração e a quantidade de tuberculina variam muito, em decorrência do

tamanho muito diferenciado dos animais e da utilização de locais alternativos no caso do animal não poder ser manejado ou sedado para permitir leitura adequada no local de preferência para inoculação (STERNBERG *et al.*, 2002). Ainda, testes falso-positivos na tuberculinização podem resultar de sensibilização a outras micobactérias (BEYNON e COOPER, 1991). Animais com infecção tanto por *M. bovis* quanto por *M. tuberculosis* reagem quase da mesma maneira à tuberculina derivada de qualquer um dos dois microrganismos (THOEN, 1993). Em antas (*Tapirus terrestris*) de um Zoológico da Suécia, os animais foram reagentes à tuberculina bovina, mas a identificação *post-mortem* por cultivo bacteriano identificou o agente como *M. tuberculosis* (STERNBERG *et al.*, 2002). Apesar dessas limitações, a tuberculinização ainda é recomendada para a maioria dos animais de cativeiro (ISAZA, 2003).

A tuberculinização pode ser utilizada como método de triagem, mas o diagnóstico laboratorial dos casos suspeitos de tuberculose na vida silvestre é essencial para confirmação da infecção (MICHEL *et al.*, 2006). Para a coleta das amostras podem ser utilizados lavados nasais ou traqueais com solução fisiológica, assim como amostras coletadas de necropsia (OH *et al.*, 2002). Entre os exames laboratoriais, pode ser realizada a baciloscopia pela coloração de Ziehl-neelsen, para visualização dos bacilos da tuberculose e também o cultivo bacteriano para verificar crescimento dos microrganismos. Posteriormente, a identificação da espécie infectante pode ser determinada por testes bioquímicos nos isolados obtidos da cultura, como testes de produção de niacina e redução do nitrato (ALEXANDER *et al.*, 2002).

Mais recentemente, a combinação dos resultados bacteriológicos com métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a caracterização molecular do agente, tem funcionado como uma poderosa ferramenta em estudos de epidemiologia, transmissões temporais, espaciais e entre as espécies (OH *et al.*, 2002; MICHEL *et al.*, 2006).

Uma ligação epidemiológica da transmissão entre a população silvestre e os seres humanos pode ser definida com investigação das pessoas por históricos médicos, tipo de trabalho, práticas de manejo e histórico de contato com animais infectados, aliada a tuberculinização, radiografias de tórax e análise de sintomas de

tuberculose, como tosse persistente, hemoptise, sudorese noturna, dificuldade respiratória e perda de peso (OH *et al.*, 2002).

## 2.9. CONTROLE

A presença da tuberculose pode prejudicar o livre intercâmbio entre instituições para preservação das espécies (MICHEL *et al.*, 2006). Ainda, efeitos potencialmente negativos a longo prazo nas dinâmicas das populações e a ameaça direta para a sobrevivência de espécies em risco são problemas particulares para a conservação da vida silvestre. Do ponto de vista econômico, a tuberculose em mamíferos silvestres tem resultado em restrições nacionais e internacionais de comércio das espécies afetadas em diversos países (MICHEL *et al.*, 2003).

Em países desenvolvidos, o controle de *M. bovis* em animais silvestres de cativeiro, baseia-se na detecção inicial e remoção dos indivíduos infectados da coleção. O tratamento dos animais infectados normalmente não tem sido possível, devido a considerações para controle e erradicação da doença, que geralmente tem preconizado a eutanásia para todos os animais infectados e rebanhos vizinhos expostos (STERNBERG *et al.*, 2002). Nessas circunstâncias, os recintos (incluindo comedouros e bebedouros) devem ser limpos e descontaminados (THOEN, 1993). Em espécies valiosas ou em risco de extinção, o tratamento e isolamento podem ser opções viáveis (ISAZA, 2003). Medicamentos humanos para tuberculose têm sido utilizados com sucesso para animais. A isoniazida tem sido eficaz no controle da doença clínica de primatas e cervídeos. A utilização de dois ou mais medicamentos para tuberculose, como rifampicina e etambutol, simultaneamente no tratamento dos animais doentes também é indicada (THOEN, 1993).

As principais recomendações citadas para o controle da tuberculose em animais silvestres de cativeiro, são que animais adquiridos para adição em uma coleção de zoológico devem ser provenientes de colônias livres da doença. Além disso, quarentenas devem ser impostas a todos os animais novos com um período de 60 a 120 dias (BEYNON e COOPER, 1991). Calendários de tuberculinização e metodologias devem ser padronizados e realizados regularmente para animais de

zoológico, de modo a facilitar a comparação e avaliação dos resultados (STERNBERG *et al.*, 2002).

Para evitar a transmissão de *M. tuberculosis* a partir de pessoas infectadas, deve ser limitada a exposição dos animais aos visitantes com barreiras de vidro e o cuidado com os animais somente deve ser permitido a tratadores com teste de tuberculinização negativa (THOEN, 1993).

No entanto, uma vez que a tuberculose bovina tenha se estabelecido em um hospedeiro nativo de vida livre, a erradicação da doença torna-se altamente improvável. Várias implicações devem ser consideradas na escolha das medidas de controle adequadas, incluindo a preservação das espécies protegidas, a minimização do risco de transmissão para espécies domésticas e um potencial impacto na dinâmica das populações em outras espécies hospedeiras. A vacinação é sem dúvida a medida de controle de escolha para atingir esses objetivos, mas atualmente ainda não há uma vacina comprovadamente efetiva contra a tuberculose para populações silvestres (MICHEL *et al.*, 2006).

Realizar o controle da tuberculose para evitar transmissão zoonótica é muito importante para indivíduos que estão em contato constante com possíveis animais silvestres infectados. Entretanto, existem poucos estudos que tratam da segurança ocupacional de profissionais que lidam com animais silvestres em relação a exposição à tuberculose (O'BRIEN *et al.*, 2004). Possíveis maneiras de prevenção e redução da disseminação zoonótica incluem testes de tuberculinização regulares em tratadores, tratamento efetivo das pessoas e dos animais infectados, e investigação de animais com perda de peso e tosse sem explicação (MICHALAK *et al.*, 1998). Também é necessária a adesão de medidas de controle de infecção, como descontaminação dos materiais e locais de procedimentos, além da utilização de equipamentos de proteção individual durante procedimentos de contato próximo e prolongado com os animais suspeitos (OH *et al.*, 2002; O'BRIEN *et al.*, 2004).

## 2.10. CONCLUSÃO

Muitos estudos ainda são necessários pra compreender a dinâmica da tuberculose nas populações de mamíferos silvestres, e o potencial das espécies em

manter a infecção na ausência dos reservatórios. A eficácia de programas de controle e erradicação da tuberculose em animais domésticos e o controle em saúde pública podem estar relacionados ao controle da doença em animais silvestres. Além disso, a compreensão do risco de infecção que os seres humanos ou animais domésticos podem representar na emergência das doenças infecciosas nas populações silvestres será essencial para o desenvolvimento de programas efetivos de conservação das espécies afetadas e da biodiversidade.

Existe pouca informação a respeito da tuberculose em animais silvestres no Brasil. Há necessidade de maior atenção de profissionais da área e de organizações de conservação aliadas à sociedade e ao governo, em relação à existência e a transmissão da tuberculose, causada tanto por *M. bovis* quanto por *M. tuberculosis*, entre espécies domésticas, silvestres e os seres humanos.

## 2.11. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**. v. I. Bacterioses and Mycoses. 3. ed. Washington D. C.: Pan American Health Organization, 2003, 384 p.

ALEXANDER, K. A.; PLEYDELL, E.; WILLIAMS, M. C.; LANE, E. P.; NYANGE, J. F. C.; MICHEL, A. L. *Mycobacterium tuberculosis*: An Emerging Disease of Free-Ranging Wildlife. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 598-601, 2002.

BENGIS, R. G. Tuberculosis in Free-Ranging Mammals. In: Fowler, M. E.; Miller, E. **Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1999. 101-114p.

BEYNON, P. H.; COOPER, J. E. **Manual of Exotic Pets**. New edition. Gloucestershire: British Small Animal Veterinary Association, 1991, 116p.

BIAVA, J. S.; GONÇALVES, R. C.; JAVOROUSKI, M. L.; BONAT, M.; PASQUALI, O. L.; BIONDO, A. W.; VILANI, R. G. O.; MURAKAMI, P. S.; TELLES, J. E. Q. Broncoalveolar lavage (BAL) technique in two tapirs (*Tapirus terrestris*) for diagnosis of tuberculosis. In: Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens – ABRAVAS, 16, 2007, São Paulo. **Anais do congresso “Todos pela Conservação”**, São Paulo, Brasil, 2007. n. 323, p. 53.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de**

**Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT).** Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

BRIONES, V.; JUAN, L.; SÁNCHEZ, C.; VELA, A. I.; GALKA, M.; MONTERO, N.; GOYACHE, J.; ARANAZ, A.; MATEOS, A. DOMÍNGUEZ, L. Bovine tuberculosis and the endangered iberian lynx. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 189-191, 2000.

BRUNING-FANN, C. S.; SCHMITT, S. M.; FITZGERALD, S. D.; PAYEUR, J. B.; WHIPPLE, D. L.; COOLEY, T. M.; CARLSON, T. AND FRIEDRICH, P. *Mycobacterium bovis* in coyotes from Michigan. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 3, p. 632-636, 1998.

BRUNING-FANN, C. S.; SCHMITT, S. M.; FITZGERALD, S. D.; FIERKE, J. S.; FRIEDRICH, P. D.; KANEENE, J. B.; CLARKE, K. A.; BUTLER, K. L.; PAYEUR, J. B.; WHIPPLE, D. L.; COOLEY, T. M.; MILLER, J. M.; MUZO, D. P. Bovine tuberculosis in free-ranging carnivores from Michigan. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 1, p. 58–64, 2001.

CHOMEL, B. B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F. X. Wildlife, Exotic Pets, and Emerging Zoonoses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 6-11, 2007.

CLANCEY, J. K. The incidence of tuberculosis in lechwe (marsh antelope). **Tubercle**, v. 58, p. 151-156, 1977.

CLEAVELAND, S.; MLENGEYA, T.; KAZWALA, R. R.; MICHEL, A.; KAARE, M. T.; JONES, S. L.; EBLATE, E.; SHIRIMA, G. M.; PACKER, C. Tuberculosis in Tanzanian Wildlife. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 2, p. 446–453, 2005.

COLEMAN, J. D.; COOKE, M. M. *Mycobacterium bovis* infection in wildlife in New Zealand. **Tuberculosis**, v. 81, n. 3, p. 191-202, 2001.

COSTA, L. P.; LEITE, Y. L. R.; MENDES, S. L.; DITCHFIELD, A. D. Conservação de mamíferos no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 103-112, 2005.

DELAHAY, R. J.; CHEESEMAN, C. L.; CLIFTON-HADLEYS, R. S. Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in the European badger (*Meles meles*) and other British mammals. **Tuberculosis**, v. 81, p. 43-49, 2001.

GORTAZAR, C.; VICENTE, J.; SAMPER, S.; GARRIDO, J. M.; FERNÁNDEZ-DE-MERA, I.; GAVÍN, P.; JUSTE, R. A.; MARTÍN, C.; ACEVEDO, P.; DE LA PUENTE, M.; HÖFLE, U. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. **Veterinary Research**, v. 36, p. 43–52, 2005.

HUCHZERMAYER, H. F. K. A.; BRÜCKNER, G. K.; VAN HEERDEN, A.; KLEEBERG, H. H.; VAN RENSBURG, I. B. J.; KOEN, P.; LOVEDAY, R. K.

Tuberculosis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**. v. 2. United Kingdom: Oxford University Press, 1994, p. 1425-1444.

ISAZA, R. Tuberculosis in All Taxa. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 5. ed. Missouri: Saunders, 2003, p. 689-693.

LEWERIN, S. S.; OLSSON, S. L.; ELD, K.; RÖKEN, B.; GHEBREMICHAEL, S. KOIVULA, T.; KÄLLENIUS, G.; BÖLSKE, G. Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo. **The Veterinary Record**, v. 156, p. 171 - 175, 2005.

LUNA, J. O.; SANTOS, M. A. A.; DURIGON, E. L.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; DUARTE, J. M. B. Tuberculosis survey of free-ranging marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 4, p. 414–415, 2003.

MARTÍN-ATANCE, P.; PALOMARES, F.; GONZÁLEZ-CANDELA, M.; REVILLA, E.; CUBERO, M. J.; CALZADA, J.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Bovine tuberculosis in a free ranging red fox (*Vulpes vulpes*) from Donana National Park (Spain). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 2, p. 435–436, 2005.

MICHALAK, K.; AUSTIN, C.; DIESEL, S.; BACON, J. M.; ZIMMERMAN, P.; MASLOW, J. N. *Mycobacterium tuberculosis* Infection as a Zoonotic Disease: Transmission between Humans and Elephants. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 283-287, 1998.

MICHEL, A. L.; VENTER, L.; ESPIE, I. W.; COETZEE, M. L. *Mycobacterium tuberculosis* infections in eight species at the national zoological gardens of South Africa, 1991–2001. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 4, p. 364–370, 2003.

MICHEL, A. L.; BENGIS, R. G.; KEET, D. F.; HOFMEYR, M.; KLERK, L. M.; CROSS, P. C.; JOLLES, A. E.; COOPER, D.; WHYTE, I. J.; BUSS, P.; GODFROID, J. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: Implications and challenges. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 91–100, 2006.

MURAKAMI, P. M.; JAVOROUSKI, M. L.; BONAT, M.; LACERDA, O.; BROCKELT, S. R.; BIESDORF, S. M.; NAKATANI, S. M.; RIEDIGER, I. N.; FEVERKI, R. B. N.; BIAVA, J.; VILANI, R. G. O. C.; BARROS FILHO, I. R.; CAVAZZANI, L. F. M.; BIONDO, A. W. Molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in tapirs (*Tapirus terrestris*) from the Curitiba Zoo, Paraná. In: Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens – ABRAVAS, 16, 2007, São Paulo. **Anais do congresso “Todos pela Conservação”**, São Paulo, Brasil, 2007, n. 365, p. 68.

NISHI, J. S.; SHURY, T.; ELKIN, B.T. Wildlife reservoirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: strategies for management and research. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 325–338, 2006.

O'BRIEN, D. J.; FITZGERALD, S. D.; LYON, T. J.; BUTLER, K. L.; FIERKE, J. S.; CLARKE, K. R.; SCHMITT, S. M.; COOLEY, T. M.; BERRY, D. E. Tuberculous lesions in free-ranging white-tailed deer in Michigan. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 3, p. 608–613, 2001.

O'BRIEN, D. J.; YEREB, D. J.; COSGROVE, M. K.; CARLSON, E. S.; SCHMITT, S. M.; WILKINS, M. J. From the field: an occupational safety program for wildlife professionals involved with bovine tuberculosis surveillance. **Wildlife Society Bulletin**. v. 32, n. 3, p. 992–999, 2004.

OH, P.; GRANICH, R.; SCOTT, J.; SUN, B. JOSEPH, M.; STRINGFIELD, C.; THISDELL, S.; STALEY, J.; WORKMAN-MALCOLM, D.; BORENSTEIN, L.; LEHNKERING, E.; RYAN, P.; SOUKUP, J.; NITTA, A.; FLOOD, J. Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. **Emerging Infectious Diseases**. vol. 8, n. 11, p. 1290-1293, 2002.

PACHALY, J. R. **Medicina de Animais Selvagens**, Curitiba, 1992. 209p.

PAGE, L. A. **Wildlife Diseases**, New York - London: Plenum Press. 1976. 371-373 p.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R.; WHIPPLE, D. L. Susceptibility of raccoons (*Procyon lotor*) to infection with *Mycobacterium Bovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 2, p. 266–274, 2002.

SCHMITT, S. M.; FITZGERALD, S. D.; COOLEY, T. M.; BRUNING-FANN, C. S.; SULLIVAN, L.; BERRY, D.; CARLSON, T.; MINNIS, R. B.; PAYEUR, J. B.; SIKARSKIE, J. Bovine tuberculosis in free-ranging white-tailed deer from Michigan. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 33, n. 4, p. 749-758, 1997.

STERNBERG, S.; BERNODT, K.; HOLMSTRÖM, A.; RÖKEN, B. Survey of tuberculin testing in swedish zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 4, p. 378–380, 2002.

THOEN, C. O. Tuberculosis and other mycobacterial diseases in captive wild animals. In: FOWLER, M.E. **Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy 3**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. p. 45-49.

TWOMEY, D. F.; CRAWSHAW, T. R.; ANSCOMBE, J. E.; FARRANT, L.; EVANS, L. J.; MCELLIGOTT, W. S.; HIGGINS, R. J.; DEAN, G.; VORDERMEIER, M.; JAHANS, K.; RUA-DOMENECH, R. TB in llamas caused by *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Records**, v. 160, p. 170, 2007.

WOODFORD, M. H. Tuberculosis in wildlife in the Ruwenzori National Park, Uganda (Part II). **Tropical Animal Health and Production**, v. 14, p. 155-160, 1982.

### **3. CAPÍTULO 03 - IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium bovis* EM QUATIS (*Nasua nasua*)**

(Parte desse trabalho foi aceito para apresentação no II Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária - CNSPV, 2007. Fortaleza / CE, Brasil).

#### **RESUMO**

A tuberculose é encontrada mundialmente, podendo afetar seres humanos, animais domésticos e silvestres. A espécie *Mycobacterium bovis* tem sido descrita tanto em populações silvestres de vida livre como de cativeiro, causando doença grave e letal em indivíduos susceptíveis. Além disso, animais silvestres de cativeiro normalmente possuem maior contato com seres humanos e animais domésticos, aumentando o risco da transmissão entre essas espécies. Quatro quatis (*Nasua nasua*) jovens foram utilizados neste estudo, sendo três machos e uma fêmea, provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres em Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. Devido ao histórico de óbito de um quati com lesões pulmonares compatíveis com tuberculose, os quatro animais foram sedados, colhidas amostras de lavado broncoalveolar, e realizados testes de tuberculinização intradérmica. Todos os animais foram reagentes a tuberculina; um deles morreu um dia após o exame. Os outros três sofreram eutanásia devido ao risco de transmissão para seres humanos e outros animais. Exames *post-mortem* de cultivo bacteriológico, baciloscopia e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizados e identificaram o agente como *Mycobacterium bovis*. Os funcionários em contato com os animais suspeitos também foram testados com tuberculina; um deles foi reagente, mas o exame radiográfico e a baciloscopia foram negativos. Os testes laboratoriais foram cruciais para o diagnóstico específico e definitivo para o agente desta tuberculose. A identificação da tuberculose bovina em animais silvestres contribui para o melhor entendimento da doença nestes potenciais reservatórios, e pode ser usado como instrumento no controle em saúde animal e saúde pública.

**PALAVRAS-CHAVE:** animais silvestres, diagnóstico, PCR, quatis, tuberculose.

IDENTIFICATION OF *Mycobacterium bovis* IN COATIS (*Nasua nasua*)

## ABSTRACT

Tuberculosis is found worldwide and may affect human beings, livestock and wildlife. The *Mycobacterium bovis* specie has been reported in both free-range and captive wildlife populations, causing severe and lethal disease in susceptible individuals. Besides, captive wildlife normally has more contact with human beings and domestic animals, increasing the transmission risk among these species. Four young coatis (*Nasua nasua*), three males and one female, from the Tijucas do Sul Triage Center, Parana, Brazil were used in the study. Due to a previous death of a coati with pulmonary lesions compatible with tuberculosis, the four coatis were sedated, broncoalveolar lavage samples were individually obtained, and simple intradermal tuberculin tests were performed. All animals were reagents to tuberculin; one died at the following day. The other three were euthanized due to the transmission risk to human beings or other animals. *Post-mortem* exams of bacterial culture, bacilloscopy and Polymerase Chain Reaction (PCR) were performed and identified the agent as *Mycobacterium bovis*. Employees who had contact to suspicious animals were also tested with tuberculin; one was reagent, but radiographic exam and bacilloscopy were negative. The laboratory tests were crucial to the specific and definitive diagnosis of the agent of this tuberculosis. Identification of bovine tuberculosis in wildlife animals contributes to better understanding of the disease in potential reservoirs, and also may be used as tool for control in both animal and public health.

KEY WORDS: wildlife, diagnosis, PCR, coatis, tuberculosis.

### 3.1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma infecção crônica grave causada por microrganismos do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que afeta animais e seres humanos do mundo inteiro (HUARD *et al.*, 2003; PATE *et al.*, 2006). Membros clássicos do complexo são *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium microti*, que apresentam uma alta homogeneidade na seqüência de nucleotídeos do material genético, apesar de variarem em certos aspectos como patogenicidade e preferência de hospedeiros (HUARD *et al.*, 2003). Recentemente, três novas espécies foram introduzidas no complexo: *Mycobacterium canettii* (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1997), *Mycobacterium caprae* (ARANAZ *et al.*, 1999) e *Mycobacterium pinnipedii* (COUSINS *et al.*, 2003).

A espécie *M. bovis*, principal agente causador da tuberculose em bovinos (MICHEL *et al.*, 2003), tem sido extensamente documentada tanto em populações de animais silvestres de vida livre como de cativeiro (ALEXANDER *et al.*, 2002), podendo causar doença grave e letal em animais susceptíveis à doença, inclusive espécies em extinção (COLEMAN e COOKE, 2001; MICHEL *et al.*, 2003). No entanto, acredita-se que a tuberculose seja mais comum em cativeiro, pois geralmente há maior proximidade com seres humanos e animais domésticos, possibilitando a transmissão de doenças entre essas espécies (MICHEL *et al.*, 2003; PATE *et al.*, 2006). Além disso, muitas vezes esses animais vivem sob condição de intenso estresse, alta densidade populacional e condições inadequadas de nutrição e higiene, tornando-os mais suscetíveis a infecções.

O impacto da tuberculose nas populações silvestres pode ainda ter significância econômica e epidemiológica quando a espécie é um reservatório de infecção para animais domésticos (CORNER, 2006; PATE *et al.*, 2006), prejudicando programas de controle e erradicação da tuberculose, que é realizado por testes, sacrifícios e inspeções de carcaças no abatedouro (COLEMAN e COOKE, 2001; ALEXANDER *et al.*, 2002; BRASIL, 2006). Além disso, a tuberculose em silvestres, também pode ter importância em saúde pública, se eles são uma fonte de infecção para profissionais ou tratadores que lidam com esses animais

(O'BRIEN *et al.*, 2004; BIET *et al.*, 2005), e até mesmo para o público que visita zoológicos e outros locais de exposição de espécies silvestres (PATE *et al.*, 2006).

Dessa forma, realizar o diagnóstico da tuberculose nos animais silvestres é de extrema importância para saúde pública, saúde animal e epidemiologia. Os testes diagnósticos são ferramentas essenciais para controle da doença (RYAN *et al.*, 2006). No entanto, a identificação da tuberculose nessas espécies é complexa, pois não existem requisitos oficiais ou recomendações para testes regulares, nem padrões de referência para realizar e interpretar os exames em animais silvestres. Conseqüentemente, veterinários dependem de sua própria experiência e de seus colegas para saber quando ou como realizá-los (STERNBERG *et al.*, 2002).

Os quatis, *Nasua nasua* (Carnivora, Procyonidae), apresentam ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo desde a Colômbia e a Venezuela até o norte do Uruguai e Argentina (NOWAK, 1991). Embora seja uma espécie relativamente comum, aspectos como comportamento e patologia ainda são pouco estudados (BEISIEGEL, 2001). Apenas um relato de infecção natural por *M. bovis* foi encontrado, em uma espécie diferente de quati (*Nasua narica*), ou quati-de-nariz-branco, apresentando infecção que progrediu rapidamente com lesões disseminadas, no entanto, o método de diagnóstico não foi especificado (GRIFFITH, 1939). Guaxinins (*Procyon lotor*), membros da mesma família que os quatis, foram submetidos à infecção experimental por *M. bovis* e mostraram-se susceptíveis à doença apresentando lesões granulomatosas (PALMER *et al.*, 2002).

Desse modo, o presente artigo teve por objetivo a identificação de *M. bovis* em quatis de Centro de Triagem de Animais Silvestres, associando as técnicas de diagnóstico *ante* e *post-mortem* para tuberculose, incluindo tuberculinização, cultivo bacteriano, baciloscopia e detecção molecular; assim como realçar a importância da identificação desses microrganismos em animais silvestres.

## 3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1. Animais

Os quatis (*Nasua nasua*) foram provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres (Cetas) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) do município de Tijucas do Sul no Paraná, Brasil. Os Centros de Triagem de Animais Silvestres têm a finalidade de recepcionar, triar e tratar os animais silvestres resgatados ou apreendidos pelos órgãos fiscalizadores, assim como eventualmente, receber animais silvestres de particulares que os mantinham de forma irregular como animais de estimação. Após serem examinados, os animais ficam sob quarentena e observação para receber nutrição adequada e identificar o aparecimento de possíveis doenças ou se recuperar de eventuais lesões. O destino dos animais apreendidos pode ser zoológicos, criadouros registrados no Ibama, centros de pesquisa ou devolução à vida livre (IBAMA, 2007).

Em 30 de outubro de 2006 um quati jovem, fêmea, veio a óbito sem sinais clínicos e na necropsia foram observadas lesões macroscópicas de abscessos pulmonares multifocais e aumento global de linfonodos submandibulares, axilares e torácicos. Foi concluído no laudo de necropsia que o animal apresentava pneumonia abscedante sugestiva de micobacteriose. Como havia mais quatro espécimes jovens (três machos e uma fêmea) no mesmo recinto e um deles começava a apresentar sinais clínicos de letargia e emagrecimento, suspeitava-se que todos estivessem infectados. Dessa forma, em dezembro de 2006, foi realizada uma bateria de testes e exames, descritos posteriormente, que confirmaram a doença.

Cinco dias após a realização dos exames, por decisão do Cetas, foi realizada a eutanásia dos animais positivos para tuberculinização, totalizando 3 quatis (um dos quatis macho já estava debilitado na ocasião do procedimento de lavado broncoalveolar, veio a óbito um dia depois e não foram realizados exames laboratoriais dos órgãos da necropsia). Após a eutanásia foram realizados diversos exames *post-mortem*.

### 3.2.2. Amostras

Os quatis foram contidos fisicamente com auxílio de puçás, retirados dos recintos e submetidos à contenção química com cetamina 70 mg, midazolam 5 mg e tartarato de butorfanol 2 mg. Foram realizadas radiografias torácicas nos quatis, e em seguida foi realizada a coleta do lavado broncoalveolar. Este foi obtido com auxílio de um laringoscópio e de uma sonda introduzida até os brônquios. Cerca de 10 mL de solução fisiológica foi infundida, e em seguida o material foi aspirado e armazenado em tubos de coleta. Uma alíquota de lavado broncoalveolar de cada animal foi enviada respectivamente para cultura, baciloscopia e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Após a eutanásia, durante a necropsia foram examinados macroscopicamente todos os órgãos dos animais e foram coletados os pulmões e os linfonodos em solução fisiológica para realização de cultivo bacteriano e PCR.

### 3.2.3. Tuberculinização

Foi realizada a tuberculinização intradérmica simples dos quatis na prega caudal com 0,1 mL de tuberculina bovina. Foi realizado também um teste de tuberculinização simples em quatro funcionários do Cetas que estiveram em contato com os animais suspeitos, com utilização de tuberculina (PPD-Rt23) aplicada por via intradérmica, no terço médio do antebraço esquerdo, na dose de 0,1 mL equivalente a duas unidades tuberculínicas (BRASIL, 2002).

### 3.2.4. Cultivo Bacteriano e Baciloscopia

As amostras de lavado broncoalveolar e de necropsia foram enviadas para Laboratórios Estaduais da Saúde e da Agricultura do Paraná para cultivo bacteriano. O material foi homogeneizado e várias alíquotas da mesma amostra foram descontaminadas com solução de NaOH 4 % e posteriormente neutralizadas com solução de HCl 1,0 N. Após a neutralização, os sedimentos foram semeados em

tubos contendo meio de cultura sólido de Lowenstein-Jensen. As culturas foram incubadas a 37 °C e controladas semanalmente para verificar o crescimento de colônias durante 40 a 60 dias (BRASIL, 1994).

A visualização dos bacilos álcool-ácido resistentes foi realizada por baciloscopia das amostras de lavado broncoalveolar em coloração de Ziehl-Neelsen, segundo técnica do Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994).

### 3.2.5. Reação em Cadeia da Polimerase

A extração e a purificação do DNA foram realizadas nas amostras de lavado broncoalveolar por um kit comercial (NucliSens, bioMérieux bv, Boxtel, Holanda) que se baseia nas propriedades de lise e inativação de nucleases do tiocianato de guanidina, junto a propriedades de ligação dos ácidos nucleicos a partículas de sílica, que podem ser eluídos após a lavagem. Esse kit comercial foi originado a partir do método desenvolvido por BOOM *et al.* (1990). Os isolados obtidos das colônias cultivadas em meio de Lowenstein-Jensen foram extraídos por choque térmico, que consistia de três ciclos de 30 minutos a 94 °C e 30 minutos a -20 °C para inativação do agente e liberação do material genético.

Para todos os protocolos de PCR foram preparadas reações com volume final de 50 µl, contendo 5 µl (1/10 do volume total) de tampão 10X Taq DNA Polimerase, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmoles de cada oligonucleotídeo (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5 µl de DNA extraído. Foi utilizado 0,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para cada reação. O volume final foi obtido com acréscimo de água ultrapura.

Inicialmente, as amostras de lavado broncoalveolar e dos isolados obtidos a partir do cultivo dos quatis foram submetidas à amplificação da região IS6110, que identifica indiferenciadamente membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, pela utilização de pares de oligonucleotídeos descritos anteriormente (EISENACH *et al.*, 1990), que resultam em amplificação de regiões de DNA de 123 pares de bases (bp). Todas as baterias de reação foram acompanhadas por um controle da reação ou branco (5 µl de água ultrapura) e um controle positivo (5 µl de DNA de *M.*

*tuberculosis* H37 Rv cepa ATCC 27294 ou *M. bovis* cepa ATCC 19210). Além disso, foi realizada a PCR para amplificação da região IS1245, que detecta *Mycobacterium avium* por fragmentos de 140 bp (NAKATANI, 2002). Todas as baterias de reação foram acompanhadas por um controle da reação ou branco (5 µl de água ultrapura) e um controle positivo (5 µl de DNA de *M. avium* cepa ATCC 25291).

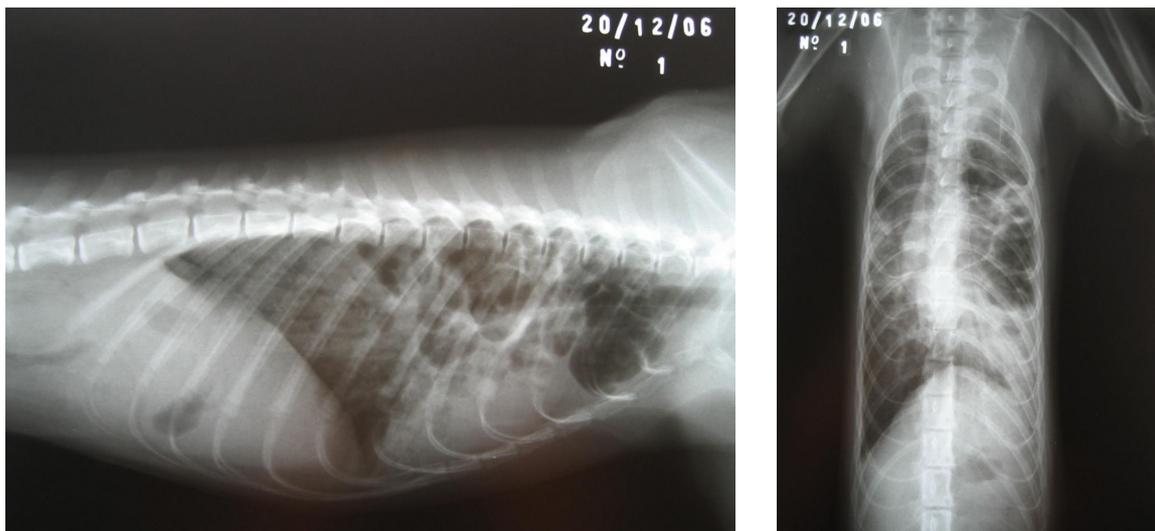
Posteriormente, as amostras de lavado broncoalveolar e dos isolados obtidos a partir do cultivo dos quatis também foram submetidas a uma tipificação por PCR específica que diferencia as espécies do complexo *M. tuberculosis* em *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, ou *M. caprae*. Para isso, foram utilizados sete pares de oligonucleotídeos que amplificam as regiões 16S rRNA, Rv0577, IS1561, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8 e Rv3120, formando segmentos de DNA de 543, 786, 943, 1033, 1116, 999 e 404 pares de bases, respectivamente. Esses oligonucleotídeos são baseados em regiões de diferenças genômicas, consistindo em regiões de DNA que estão presentes em *M. tuberculosis*, mas diferenciadamente deletados em vários outros membros do complexo. O resultado das amplificações forma um painel de identificação das espécies segundo método descrito por HUARD *et al.* (2003). O programa de amplificação consistiu em 5 minutos de desnaturação inicial a 94 °C e 35 ciclos de amplificação de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 57 °C, 1 minuto a 72 °C e um estágio final de extensão a 72 °C durante 10 minutos.

Todas as reações foram processadas no mesmo termociclador (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster, CA, EUA). O padrão dos produtos de amplificação de todas as reações foi obtido por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, impregnados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizados com transiluminador ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação (Elektrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak, Rochester, NY, EUA). Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Achados Clínicos e Patológicos

Apenas um dos quatis apresentou evidente alteração na radiografia pulmonar, com áreas de aumento da radiopacidade pulmonar, indicativas de lesões por tuberculose (FIGURA 1). Os outros animais apresentavam nódulos pulmonares mais discretos. Já as lesões macroscópicas observadas nos quatis durante a necropsia foram abscessos pulmonares multifocais, enfisema pulmonar e aumento global de linfonodos submandibulares, axilares e torácicos (FIGURA 2). Os demais órgãos apresentavam-se normais.



**FIGURA 1 - RADIOGRAFIA TORÁCICA DE QUATI (*Nasua nasua*) COM AUMENTO DA RADIOPACIDADE PULMONAR, EVIDENCIANDO O PROCESSO RESPIRATÓRIO DA TUBERCULOSE.**



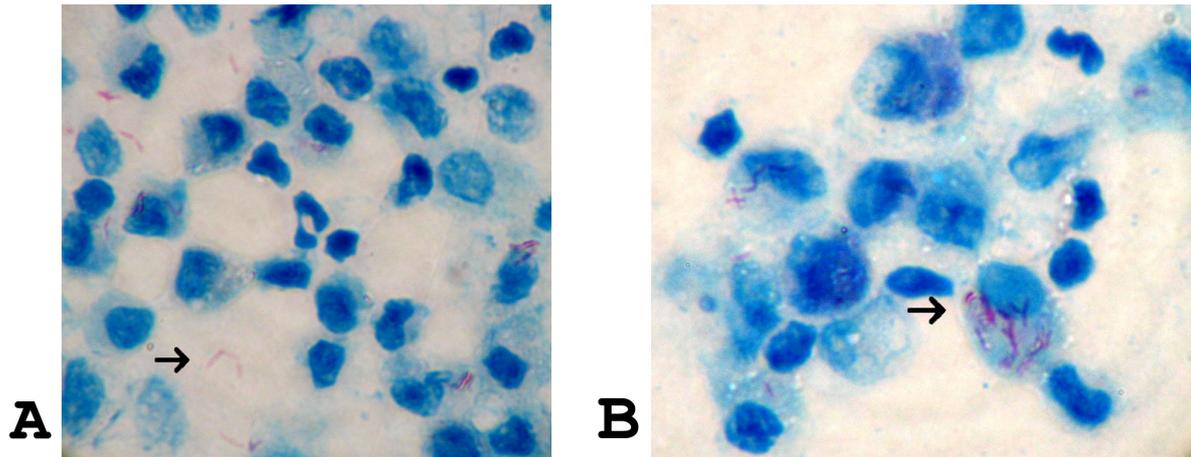
**FIGURA 2 - ABCESSOS PULMONARES MULTIFOCAIS E ENFISEMA PULMONAR EM QUATI (*Nasua nasua*), COMPATÍVEIS COM O QUADRO RESPIRATÓRIO DE TUBERCULOSE.**

### 3.3.2. Tuberculinização

Todos os quatis foram reagentes à tuberculina bovina, apresentando edema e hiperemia local após 72 horas da administração. Em relação aos funcionários, apenas um foi reagente, apresentando medida do diâmetro transversal de 40 mm, considerado reator forte (BRASIL, 2002). No entanto, esse funcionário não apresentou visualização de bacilos álcool-ácido resistentes à baciloscopia do escarro, nem alterações visíveis à radiografia torácica.

### 3.3.3. Isolamento Bacteriano

Embora três quatis tenham apresentado baciloscopia positiva (FIGURA 3), não houve crescimento de colônias características de *Mycobacterium sp.* nas amostras de lavado broncoalveolar em meio de Lowenstein-Jensen. No entanto, houve crescimento de colônias compatíveis com micobactérias no cultivo bacteriano proveniente das lesões pulmonares nas amostras dos quatis coletadas à necropsia.

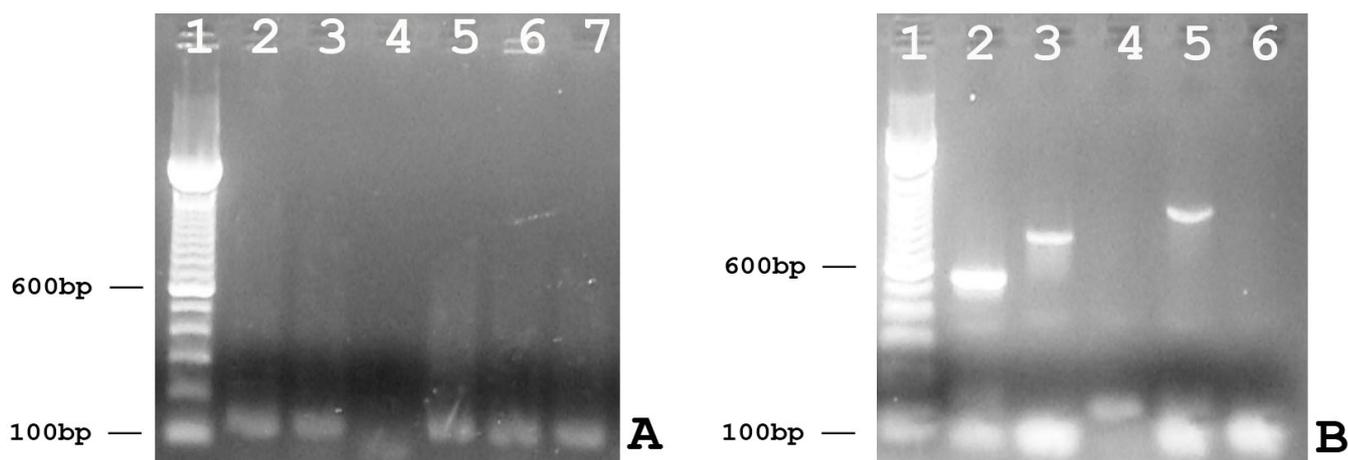


**FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DE LÂMINA COM COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEESEN DE LAVADO BRONCOALVEOLAR DE QUATIS (*Nasua nasua*).**

Bacilos álcool-ácido resistentes visualizados em vermelho da fucsina ácida (setas em preto) com coloração de fundo de azul de metileno. (A: 500X e B: 1.000X).

#### 3.3.4. PCR e Diferenciação de Espécies

Houve a amplificação da região IS6110 na PCR direta dos lavados broncoalveolares e nos isolados obtidos a partir do cultivo dos fragmentos de órgãos dos quatis (FIGURA 4 A). Em contrapartida, não foi detectável a amplificação do fragmento IS1245 para identificação de *M. avium* em nenhuma das amostras. Já o método de tipificação das espécies conseguiu identificar regiões de deleções compatíveis com *Mycobacterium bovis*, segundo HUARD *et al.* (2003), apenas nos isolados obtidos a partir do cultivo dos fragmentos de órgãos dos quatis (FIGURA 4 B).



**FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5 % PARA COMPLEXO *M. tuberculosis* EM AMOSTRAS DE CULTIVO DOS QUATIS (*Nasua nasua*).**

**A.** PCR geral para Complexo *M. tuberculosis* IS6110 em isolados de cultivo bacteriano. 1: marcador de peso molecular de 100 bp; 2: controle positivo (*M. tuberculosis*); 3: controle positivo (*M. bovis*); 4: branco; 5, 6 e 7: amostras positivas dos quatis (com 123 bp).

**B.** PCR para diferenciação do Complexo *M. tuberculosis*. Perfil compatível com *M. bovis* segundo HUARD *et al.* (2003). 1: marcador de peso molecular de 100 bp; 2: 16S rRNA (com 543 bp); 3: Rv0577 (com 786 bp); 4: Rv1970 (sem produto); 5: Rv3877/8 (com 999 bp); 6: Rv3120 (sem produto).

### 3.4. DISCUSSÃO

O presente estudo relata a primeira identificação de tuberculose bovina em *Nasua nasua*. O relato anterior de infecção natural por *M. bovis* em quatis envolvia uma espécie diferente, quati-de-nariz-branco (*Nasua narica*), e não houve descrição do método de diagnóstico definitivo (GRIFFITH, 1939).

Em relação à tuberculinização, outras micobactérias patogênicas e não-patogênicas, que apresentam antígenos em comum com *M. bovis*, são ubíquas do ambiente, e freqüentemente infectam e sensibilizam os animais (RYAN *et al.*, 2006). Desse modo, o teste pode apresentar reações cruzadas, dificultando a correta identificação do agente. Além disso, a tuberculinização é uma forma inexata de diagnóstico em animais silvestres, pois os locais de administração e a quantidade de tuberculina variam muito, em decorrência do tamanho dos animais ou da aplicação em locais alternativos (geralmente na pálpebra) para possibilitar leitura adequada, quando o animal não possa ser manejado ou sedado (STERNBERG *et al.*, 2002). No presente estudo houve possibilidade de manuseio dos animais, que foram

submetidos à tuberculinização padrão como um teste de triagem para a posterior realização dos exames confirmatórios.

Para muitas espécies silvestres, não existem exames *ante-mortem* disponíveis até o momento e o diagnóstico da infecção por *M. bovis* depende apenas de cultura e histopatologia (MICHEL *et al.*, 2006). Dessa forma, os exames realizados no lavado broncoalveolar foram de grande importância para o estabelecimento de um diagnóstico *ante-mortem* da tuberculose nos quatis. Em relação aos resultados laboratoriais, no caso específico das micobactérias, o crescimento das colônias é lento, levando de 40 a 60 dias em meio de cultivo sólido de Lowenstein-Jensen (BRASIL, 1994). No presente estudo, ocorreu o crescimento de bacilos da tuberculose em meio de cultura apenas das lesões pulmonares provenientes da necropsia, pois nas amostras de lavado broncoalveolar, apesar da visualização na baciloscopia, provavelmente os microrganismos não estavam mais viáveis para cultivo bacteriano.

Na PCR do lavado broncoalveolar, apenas dois animais foram detectáveis para amplificação do segmento IS 6110 (EISENACH *et al.*, 1990), provavelmente em razão da menor quantidade de material genético nas amostras provenientes deste tipo de coleta. No entanto, as amostras do cultivo bacteriano foram positivas para o método de tipificação baseado na PCR (HUARD *et al.*, 2003), possibilitando a confirmação da espécie infectante como *M. bovis*. O material isolado do cultivo bacteriano, provavelmente por apresentar grande quantidade de microrganismos na amostra, foi mais adequado para métodos menos sensíveis de biologia molecular, como a tipificação por PCR. Deste modo, para o diagnóstico molecular dos casos suspeitos de tuberculose bovina na vida silvestre é essencial a associação de PCR aplicada ao lavado broncoalveolar e ao cultivo bacteriano, fornecendo assim uma poderosa ferramenta para auxiliar no estudo da transmissão espacial, temporal e entre espécies desse agente (MICHEL *et al.*, 2006).

Conforme descrito anteriormente, o Cetas possui animais provenientes de diversas regiões do estado, muitas vezes com saúde prejudicada e com histórico médico desconhecido. Nesse tipo de local, sinais vagos e não específicos de tuberculose podem passar despercebidos em animais que não são facilmente manejáveis (STERNBERG *et al.*, 2002). Além disso, contato íntimo, áreas comuns para alimentação e fornecimento de água de beber, dificuldade em desinfetar

adequadamente áreas externas e a exposição aos seres humanos favorecem a manutenção e a sobrevivência da tuberculose em animais de cativeiro (MICHEL *et al.*, 2003).

No presente estudo, os quatis foram provenientes de localidades diversas do Estado do Paraná e não foram identificados individualmente em razão do grande fluxo de animais e da curta permanência dos animais no Cetas. Dessa forma, não foi possível definir com precisão como ocorreu a doença, bem como quais animais foram inicialmente infectados. No entanto, como os quatis apresentavam evoluções clínicas diferentes entre si, suspeita-se que um deles tenha sido exposto à tuberculose antes da sua chegada ao Cetas, provavelmente por bovinos ou outras espécies contaminadas, e quando locado no mesmo recinto que os demais quatis, teria infectado os outros animais. A possibilidade de que outros mamíferos ou mesmo funcionários do Cetas tenham infectado os quatis é remota, pois nenhum outro animal demonstrou sinais clínicos ou dados compatíveis em necropsia e o único funcionário positivo na tuberculinização não apresentava a doença na forma ativa.

Como o funcionário reagente na tuberculinização não apresentava imunossupressão e a espécie de micobactéria é atípica para os seres humanos, o mesmo pode ter sido infectado pelo contato com os quatis, mas não apresentar a forma ativa da doença. A tuberculose bovina deve ser considerada um fator de risco à saúde pública, sendo de especial importância para indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outros tipos de imunossupressão, (MICHEL *et al.*, 2006). Entretanto, ainda são poucas as ações que tratam da segurança ocupacional para tuberculose bovina, principalmente em relação à exposição enfrentada pelos profissionais que lidam com animais silvestres (O'BRIEN *et al.*, 2004). Ainda, a identificação da espécie *M. bovis* nos quatis foi importante, pois evidenciou o risco potencial de transmissão da doença entre animais silvestres e domésticos, podendo ser reservatório de importância econômica em regiões de criação bovina.

### 3.5. CONCLUSÕES

A interpretação conjunta dos testes laboratoriais foi essencial para o diagnóstico definitivo da tuberculose bovina nos quatis. A coloração em lâmina dos bacilos provou-se útil para obtenção de um resultado imediato, porém foi pouco sensível e não distinguiu entre bactérias patogênicas e não-patogênicas. A cultura microbiológica mostrou-se um método sensível, porém o crescimento das colônias foi extremamente lento e o resultado pode demorar de 40 a 60 dias. A obrigatoriedade da presença de microrganismos viáveis na amostra foi outro fator limitante, pois impossibilita o uso em amostras inadequadamente armazenadas.

A PCR mostrou-se específica, rápida e capaz de detectar o agente em amostras biológicas *ante* e *post-mortem* dos quatis no sistema IS6110. Embora a tipificação por PCR ainda dependa de cultura prévia, o método foi capaz de identificar especificamente a espécie de micobactéria envolvida.

Finalmente, calendários de tuberculinização e metodologias de coleta de amostras devem ser padronizados para animais silvestres de cativeiro, em particular para quatis. As medidas de controle e prevenção nesta espécie devem incluir o manejo correto dos animais, o exame clínico detalhado e a necropsia de animais suspeitos. O diagnóstico de tuberculose bovina em quatis alerta para a importância desta doença em saúde animal e saúde pública, pois a crescente proximidade de pessoas, animais domésticos e silvestres facilita o contato e a transmissão da doença entre estas espécies.

### 3.6. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, K. A.; PLEYDELL, E.; WILLIAMS, M. C.; LANE, E. P.; NYANGE, J. F. C.; MICHEL, A. L. *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n. 6, p. 598-601, 2002.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; GALÁN, J. C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SÚAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1263–1273, 1999.

BEISIEGEL, B. M. Notes on the coati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an Atlantic Forest area. **Brazilian journal of biology**, v. 61, n. 4, p. 689-692, 2001.

BIET, F.; BOSCHIROLI, M. L.; THOREL, M. F.; GUILLOTEAU, L. A. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). **Veterinary Research**, v. 36, p. 411–436, 2005.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5. ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

COLEMAN, J. D.; COOKE, M. M. *Mycobacterium bovis* infection in wildlife in New Zealand. **Tuberculosis**, v. 81, n. 3, p. 191-202, 2001.

CORNER, L. A. L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 303–312, 2006.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I. ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1305–1314, 2003.

EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 5, p. 977-81, 1990.

GORTAZAR, C.; VICENTE, J.; SAMPER, S.; GARRIDO, J. M.; FERNÁNDEZ-DE-MERA, I. G.; GAVÍN, P.; JUSTE, R. A.; MARTÍN, C.; ACEVEDO, P.; DE LA

PUENTE, M.; HÖFLE, U. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. **Veterinary Research**, v. 36, p. 43–52, 2005.

GRIFFITH, A. S. Infections of wild animals with tubercle bacilli and other acid fast bacilli. **Proceeding of the Royal Society of Medicine**, v. 32, p. 1405–1412, 1939.

HUARD, R. C.; LAZZARINI, L. C. O.; BUTLER, W. R.; SOOLINGEN, D.; HO, J. L. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1637-1650, 2003.

IBAMA. **Centros de Triagem de Animais Silvestres – Cetas**. Fauna. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/fauna/cetas.php>>. Acesso em: 20 abr. 2007.

MICHEL, A. L.; VENTER, L.; ESPIE, I. W.; COETZEE, M. L. *Mycobacterium tuberculosis* infections in eight species at the national zoological gardens of South Africa, 1991–2001. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 4, p. 364–370, 2003.

MICHEL, A. L.; BENGIS, R. G.; KEET, D. F.; HOFMEYR, M.; KLERK, L. M.; CROSS, P. C.; JOLLES, A. E.; COOPER, D.; WHYTE, I. J.; BUSS, P.; GODFROID, J. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: Implications and challenges. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 91–100, 2006.

NAKATANI, S. M. Detecção Molecular do *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* em Amostras de Sangue de Pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Curitiba, 2002. 96 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. vol. 2, 5. ed. Baltimore-London: The Johns Hopkins University Press, 1991, p. 1101-1102.

O'BRIEN, D. J.; YEREB, D. J.; COSGROVE, M. K.; CARLSON, E. S.; SCHMITT, S. M.; WILKINS, M. J. From the field: an occupational safety program for wildlife professionals involved with bovine tuberculosis surveillance. **Wildlife Society Bulletin**, v. 32, n. 3, p. 992–999, 2004.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R.; WHIPPLE, D. L. Susceptibility of raccoons (*Procyon lotor*) to infection with *Mycobacterium Bovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 2, p. 266–274, 2002.

PATE, M.; SVARA, T.; GOMBAC, M.; PALLER, T.; ZOLNIR-DOVC, M.; EMERSIC, I.; PRODINGER, W. M.; BARTOS, M.; ZDOVC, I.; KRT, B.; PAVLIK, I.; CVETNIC, Z.; POGACNIK, M.; OCEPEK, M. Outbreak of tuberculosis caused by

*Mycobacterium caprae* in a zoological garden. **Journal of Veterinary Medicine Series B.**, v. 53, p. 387–392, 2006.

RYAN, T. J.; LIVINGSTONE, P. G.; RAMSEY, D. S. L.; LISLE, G. W.; NUGENT, G.; COLLINS, D. M.; BUDDLE, B. M. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v. 112 p. 211–219, 2006.

STERNBERG, S.; BERNODT, K.; HOLMSTRÖM, A.; RÖKEN, B. Survey of tuberculin testing in swedish zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 4, p. 378–380, 2002.

VAN SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; HAAS, P. E.; HERMANS, P. W.; KOEDAM, M. A.; TEPPEMA, K. S.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L. M.; VAN EMBDEN, J. D. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 1236–1245, 1997.

#### **4. CAPÍTULO 04 - IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* EM ANTAS (*Tapirus terrestris*) NO BRASIL**

(Parte desse trabalho foi apresentado no XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens – ABRAVAS, 2007. São Paulo, Brasil).

##### **RESUMO**

A tuberculose é uma doença crônica grave, de distribuição mundial, que pode afetar seres humanos, animais domésticos e silvestres. A bactéria *Mycobacterium tuberculosis* tem sido documentada em espécimes silvestres em contato próximo e prolongado com seres humanos. Em junho de 2006, uma anta (*Tapirus terrestris*) do Zoológico Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil, apresentava episódios de tosse crônica e histórico de óbito de outras antas com suspeita de tuberculose. Amostras de secreção nasal foram coletadas deste animal e submetidas ao cultivo bacteriano e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Apesar de não haver crescimento na cultura, a PCR apresentou resultado detectável para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Nova coleta foi realizada por endoscopia em novembro de 2006, com amostras de lavado broncoalveolar no mesmo animal e em outro do mesmo recinto. As amostras foram encaminhadas para realização de exames laboratoriais. A baciloscopia e a PCR realizadas diretamente do lavado broncoalveolar foram negativas para ambos os animais. Entretanto, uma amostra apresentou crescimento de colônias compatíveis com micobactérias. A PCR do isolado obtido a partir da cultura identificou o agente como *Mycobacterium tuberculosis*. Todos os cinquenta funcionários do zoológico foram submetidos ao teste de tuberculinização intradérmica, quatro foram reagentes, mas apresentaram exame radiográfico e baciloscopia negativos. A identificação de *Mycobacterium tuberculosis* em antas pelos testes laboratoriais, alerta para o potencial risco de transmissão da infecção entre seres humanos e animais silvestres.

**PALAVRAS-CHAVE:** animais silvestres, antas, diagnóstico, PCR, tuberculose.

## IDENTIFICATION OF *Mycobacterium tuberculosis* IN TAPIRS (*Tapirus terrestris*) IN BRAZIL

### ABSTRACT

Tuberculosis is a severe chronic disease, found worldwide, that may affect human beings, livestock and wildlife animals. The *Mycobacterium tuberculosis* bacterium has been reported in captive wildlife populations in close and prolonged contact with human beings. On June, 2006 a tapir (*Tapirus terrestris*) from Curitiba Zoo, Parana, Brazil, presented chronic coughing and history of previous death of other tapirs with lesions compatible with tuberculosis. Nasal secretion samples were collected from this animal and submitted to bacterial culture and Polymerase Chain Reaction (PCR). Despite absence of culture growing, PCR presented a detectable result to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. New sampling was performed through endoscopy on November, 2006, with samples of broncoalveolar lavage from the same animal and other from the same confinement. Bacilloscopy and PCR performed directly from broncoalveolar lavage were negative for both animals. However, one sample presented colony growth compatible with mycobacteria. PCR performed on culture isolate identified the agent as *Mycobacterium tuberculosis*. All fifty zoo employees were submitted to tuberculin skin test, four were reagent but presented negative radiographic exam and bacilloscopy. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* in tapirs through laboratory tests, alerts for the potential transmission risk among human beings and wildlife animals.

KEY WORDS: wildlife, tapirs, diagnosis, PCR, tuberculosis.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

A tuberculose afeta animais e seres humanos do mundo inteiro e é principalmente causada pelo Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (PATE *et al.*, 2006), formado por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1997; ARANAZ *et al.*, 1999; COUSINS *et al.*, 2003; HUARD *et al.*, 2003). Essas bactérias apresentam uma alta homogeneidade na seqüência de nucleotídeos do material genético, apesar de variarem em certos aspectos como patogenicidade e preferência de hospedeiros (HUARD *et al.*, 2003).

A espécie *M. tuberculosis*, considerada primariamente um patógeno humano, tem sido relatada mais freqüentemente em espécies silvestres que vivem em contato próximo e prolongado com seres humanos (MICHALAK *et al.*, 1998) ou animais domésticos. Nesse cenário, os zoológicos se encontram em uma situação particular de preocupação em saúde pública, devido ao contato próximo entre animais e seres humanos suscetíveis a tuberculose, especialmente tratadores dos animais e visitantes das atrações ou exposições (OH *et al.*, 2002). Os animais dos zoológicos podem agir como reservatórios da doença, interferindo em programas de controle da doença em seres humanos e outros animais (MICHEL *et al.*, 2003). Além disso, contato íntimo em cativeiro, áreas comuns para alimentação e fornecimento de água de beber, dificuldade em desinfetar adequadamente áreas externas e a exposição aos visitantes favorecem a manutenção e a sobrevivência da tuberculose nesses locais (MONTALI *et al.*, 2001).

Dessa forma, realizar o diagnóstico da tuberculose nos animais silvestres é de extrema importância tanto para saúde pública como para saúde animal (RYAN *et al.*, 2006). Entretanto, a identificação da tuberculose nessas espécies é complexa, pois muitas vezes o método utilizado comumente para os seres humanos ou para os animais domésticos não pode ser utilizado para os silvestres. Além disso, não existem requisitos oficiais ou recomendações para testes regulares, nem padrões de referência para realizar e interpretar os exames em animais silvestres (STERNBERG *et al.*, 2002).

As antas, *Tapirus terrestris* (Perissodactyla, Tapiridae), estão presentes desde Colômbia e Venezuela, até o Norte da Argentina e Sul do Brasil (NOWAK, 1991). Esses animais parecem ser altamente susceptíveis à tuberculose. Foram encontrados relatos de infecção por *M. tuberculosis* em uma anta do Jardim Zoológico Nacional da África do Sul, com diagnóstico realizado *post-mortem* por cultura e detecção molecular (MICHEL *et al.*, 2003), e em Zoológico da Suécia, com identificação realizada igualmente de forma *post-mortem* por cultivo bacteriano (STERNBERG *et al.*, 2002).

O presente artigo teve por objetivo a identificação de *M. tuberculosis* em antas em Zoológico Municipal de Curitiba, associando técnicas de diagnóstico *ante-mortem* para tuberculose, incluindo cultivo bacteriano, baciloscopia e detecção molecular; e ainda enfatizar a importância da identificação desses microrganismos em animais silvestres de cativeiro.

## 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1. Histórico

Em 1999, veio a óbito um espécime de *T. terrestris* do Zoológico Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil que apresentava problemas respiratórios. O diagnóstico foi sugestivo de tuberculose, pois a necropsia, o animal apresentava-se magro, com massas endurecidas e alguns abscessos nos pulmões, com todos os lobos afetados. O baço apresentava pequenas manchas puntiformes esbranquiçadas. Na ocasião, os espécimes restantes foram tuberculinizados, mas apresentaram resultados negativos.

Posteriormente, em 2001, outro espécime também veio a óbito apresentando emagrecimento progressivo e episódios de tosse. No laudo de necropsia, constava que os pulmões estavam muito alterados, com três tipos de anomalias: lóbulo apical direito enegrecido com muito líquido seroso e tecido pulmonar necrosado, vários abscessos com diâmetro de aproximadamente 1,5 a 2 cm contendo pus amarelo, aspecto cremoso por todo o parênquima pulmonar em todos os lóbulos e pequenos

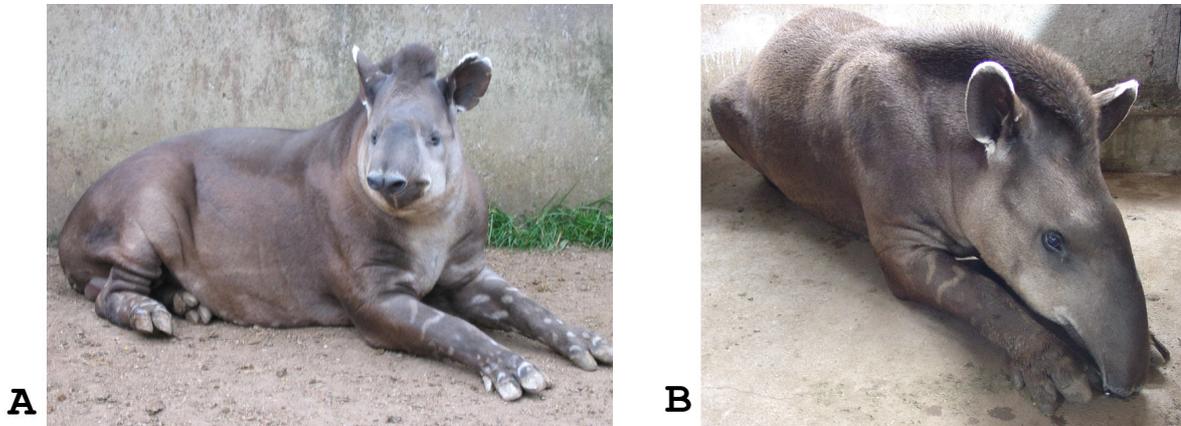
nódulos amarelados e endurecidos com aspecto de couve-flor nos dois lóbulos basais e no parênquima pulmonar, não em quantidade muito grande. O diagnóstico obtido pelo exame necroscópico foi de pneumonia, pois na ocasião os resultados não foram conclusivos para tuberculose.

#### 4.2.2. Animais e Amostras

Em julho de 2006 foi realizada uma coleta de secreção das narinas por esfregaço nasal em um espécime de *T. terrestris* fêmea do Zoológico Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil, pois foi relatado por veterinário responsável que o animal apresentava tosse. Além disso, havia histórico de óbito de animal do mesmo recinto com lesões pulmonares na necropsia, levando a suspeita de tuberculose. Após contenção química foram realizadas coletas de várias alíquotas de ambas as narinas do animal com o auxílio de um *swab*. Este foi embebido em solução fisiológica após a realização do esfregaço e encaminhado para realização de exames de cultivo bacteriano e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Posteriormente, em novembro de 2006, foram realizadas radiografias torácicas e coletadas amostras de lavado broncoalveolar na mesma fêmea da coleta anterior e outro macho, ambos com histórico de tosse produtiva constante e suspeita de tuberculose (FIGURA 5). Após contenção química com utilização de azaperone 160 mg mais cloridrato de medetomidina 1 mg intramuscular para o primeiro animal e azaperone 160 mg mais meperidina 200 mg intramuscular para o segundo animal, foi realizado exame clínico geral e o trato respiratório superior e inferior foi avaliado por endoscopia nasal, com coleta de amostras de lavado broncoalveolar. Foi realizada visualização das estruturas respiratórias e secreções com o endoscópio. As amostras foram obtidas próximo à bifurcação traqueal (carina) após a infusão de 60 ml de solução fisiológica, fracionada para minimizar a pressão excessiva nos alvéolos. O líquido introduzido foi removido por sucção, com seringa de 60 mL, devidamente identificadas. Concluída a aspiração da amostra, a seringa foi desacoplada da sonda e colocada em uma caixa de isopor com gelo, em seguida encaminhada imediatamente ao laboratório para análise do material (BIAVA *et al.*,

2007). Uma alíquota de lavado broncoalveolar de cada animal foi enviada para cultura, baciloscopia e PCR.



**FIGURA 5 - ANTAS (*Tapirus terrestris*) DO ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA, PARANÁ, BRASIL. A. MACHO. B. FÊMEA.**

#### 4.2.3. Tuberculinização dos Funcionários

Foi realizado o teste de tuberculinização simples em todos os 50 funcionários do zoológico, com utilização de tuberculina (PPD-Rt23) aplicada por via intradérmica, no terço médio do antebraço esquerdo, na dose de 0,1 ml equivalente a 2 unidades tuberculínicas (BRASIL, 2002).

#### 4.2.4. Cultivo Bacteriano e Baciloscopia

As amostras de secreção nasal e de lavado broncoalveolar foram enviadas para Laboratórios Estaduais da Saúde e da Agricultura do Paraná para cultivo bacteriano. O material foi homogeneizado e várias alíquotas da mesma amostra foram descontaminadas com solução de NaOH 4 % e posteriormente neutralizadas com solução de HCl 1,0 N. Após a neutralização, os sedimentos foram semeados em tubos contendo meio de cultura sólido de Lowenstein-Jensen. As culturas foram incubadas a 37 °C e controladas semanalmente para verificar o crescimento de colônias durante 40 a 60 dias (BRASIL, 1994).

A baciloscopia para visualização de possíveis bacilos álcool-ácido resistentes foi realizada nas amostras de lavado broncoalveolar por coloração de Ziehl-neelsen, segundo técnica do Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994).

#### 4.2.5. Reação em Cadeia da Polimerase

As amostras de secreção nasal, de lavado broncoalveolar e dos isolados obtidos no cultivo bacteriano foram enviadas para Laboratório Estadual de Saúde do Paraná para realização da PCR. A extração e a purificação do DNA das amostras de secreção nasal e do lavado broncoalveolar foram realizadas por kit comercial (NucliSens, bioMérieux bv, Boxtel, Holanda) originado a partir do método desenvolvido por BOOM *et al.* (1990), enquanto que a extração e a purificação do DNA dos isolados obtidos no cultivo foram realizados por choque térmico, como descrito na página 50 (capítulo 3).

Para todos os protocolos de PCR também foram preparadas reações como descrito anteriormente na página 50 (Capítulo 3).

Inicialmente, as amostras de secreção nasal da anta fêmea, assim como de lavado broncoalveolar e dos isolados obtidos no cultivo dos animais foram submetidas à amplificação da região IS6110, que identifica indiferenciadamente membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, pela utilização de pares de oligonucleotídeos descritos anteriormente (EISENACH *et al.*, 1990), que resultam em amplificação de segmentos de DNA de 123 pares de bases (bp). Todas as baterias de reação foram acompanhadas por um controle da reação ou branco (5 µl de água ultrapura) e um controle positivo (5 µl de DNA de *M. tuberculosis* H37 Rv cepa ATCC 27294 ou *M. bovis* cepa ATCC 19210). Além disso, foi realizada nas amostras a PCR para amplificação da região IS1245, que detecta *Mycobacterium avium* por fragmentos de 140 bp (NAKATANI, 2002). Todas as baterias de reação foram acompanhadas por um controle da reação ou branco (5 µl de água ultrapura) e um controle positivo (5 µl de DNA de *M. avium* cepa ATCC 25291).

Posteriormente, as amostras dos isolados obtidos no cultivo bacteriano do lavado broncoalveolar, foram submetidas a uma tipificação por PCR específica que diferencia as espécies do Complexo *M. tuberculosis* como descrito anteriormente na

página 51 (Capítulo 3). O resultado das ampliações forma um painel de identificação das espécies segundo método descrito por HUARD *et al.* (2003).

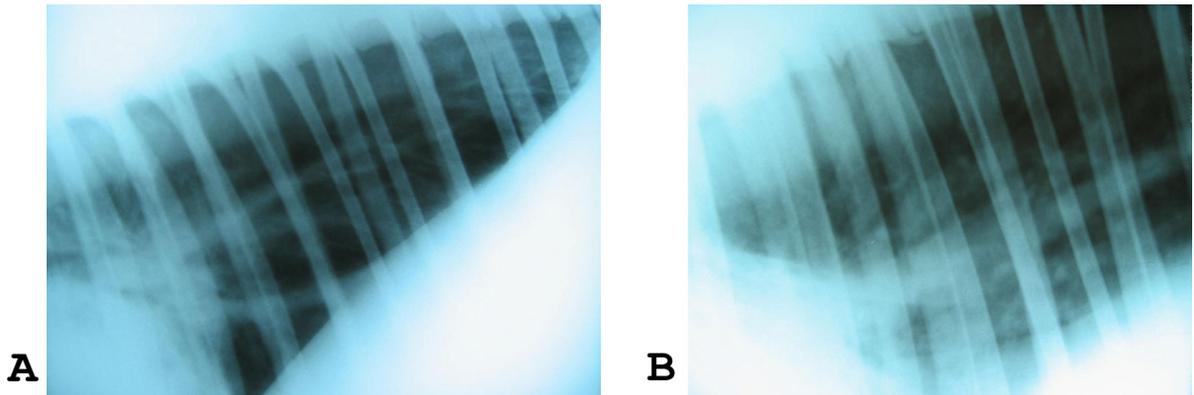
O programa de amplificação, o processamento das reações e a visualização foram realizados como descrito anteriormente na página 51 (Capítulo 3).

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Achados Clínicos

Na avaliação clínica, os animais apresentaram tosse e secreção nasal. No histórico clínico, as antas examinadas também apresentaram vários episódios de tosse, além de relatos de dificuldade respiratória e corrimento nasal abundante e purulento. Na radiografia pulmonar, não foi possível caracterizar áreas de aumento da radiopacidade pulmonar, que seriam indicativas de lesões por tuberculose (FIGURA 6).

Durante a endoscopia para a coleta de lavado broncoalveolar, no trato respiratório superior e inferior, verificou-se a presença de secreção nasal e de grande quantidade de secreção traqueal, alterações na carina e nos brônquios principais. Grande quantidade de secreção purulenta foi expelida por tosse em ambos os animais após a endoscopia e as amostras obtidas permitiram observar grande quantidade de células inflamatórias.



**FIGURA 6 - RADIOGRAFIAS PULMONARES DE ANTAS (*Tapirus terrestris*). A. MACHO. B. FÊMEA.**

#### 4.3.2. Tuberculinização

Quatro dos cinquenta funcionários (8 %) foram reagentes à tuberculinização. No entanto, nenhum desses funcionários apresentou visualização de bacilos álcool-ácido resistentes à baciloscopia do escarro, nem alterações visíveis à radiografia torácica.

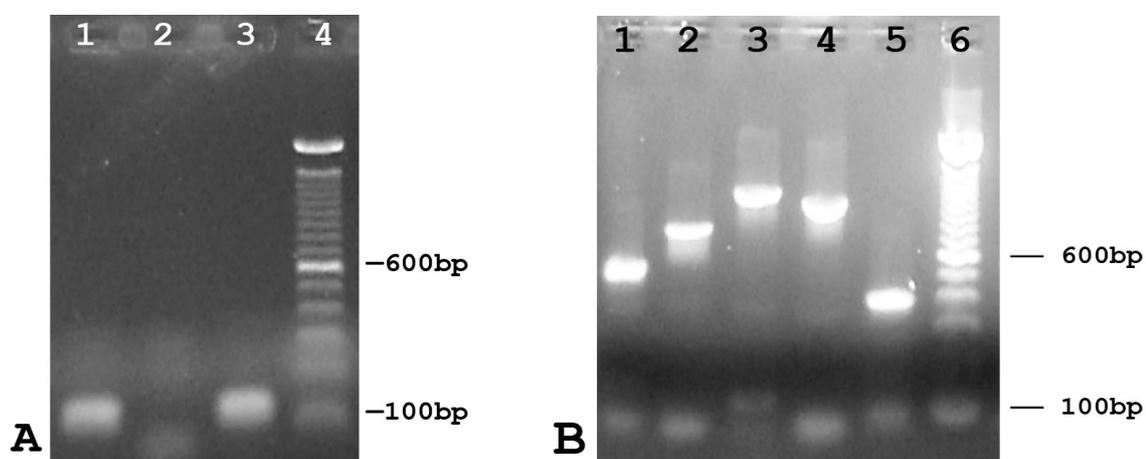
#### 4.3.3. Isolamento Bacteriano

No cultivo bacteriano proveniente da coleta de secreção nasal inicial, houve contaminação e crescimento de bactérias oportunistas no meio de cultura, impossibilitando o possível crescimento de micobactérias. Já no cultivo das amostras de lavado broncoalveolar, houve crescimento de colônias características de micobactérias somente na amostra do animal macho.

Na baciloscopia do lavado broncoalveolar não foi possível visualizar bacilos álcool-ácido resistentes em nenhuma das amostras.

#### 4.3.4. PCR e Diferenciação de Espécies

Houve a amplificação da região IS6110 por PCR da secreção nasal inicial, com aparecimento de bandas discretas e do isolado proveniente do cultivo do animal macho (FIGURA 7 A). Em contrapartida, não foi detectável em nenhum dos animais a amplificação direta do lavado broncoalveolar. A amplificação do fragmento IS1245 não foi detectável em nenhuma das amostras. Posteriormente, houve amplificação dos fragmentos do método de tipificação por PCR no isolado do cultivo bacteriano obtido a partir do lavado broncoalveolar, identificando a espécie da micobactéria infectante como *Mycobacterium tuberculosis* no animal macho (FIGURA 7 B).



**FIGURA 7 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5 % PARA COMPLEXO *M. tuberculosis* EM AMOSTRAS DE CULTIVO DAS ANTAS (*Tapirus terrestris*).**  
**A.** PCR geral para Complexo *M. tuberculosis* IS6110 em isolado de cultivo bacteriano. 1: amostra positiva do animal macho (com 123 bp); 2: branco; 3: controle positivo (*M. tuberculosis*); 4: marcador de peso molecular 100 bp. **B.** PCR para diferenciação do Complexo *M. tuberculosis*. Perfil compatível com *M. tuberculosis* segundo protocolo de HUARD *et al.* (2003). 1: 16S rRNA (com 543 bp); 2: Rv0577 (com 786 bp); 3: Rv1970 (com 1116 bp); 4: Rv3877/8 (com 999 bp); 5: Rv3120 (com 404 bp); 6: marcador de peso molecular 100 bp.

#### 4.4. DISCUSSÃO

A tuberculose é importante em animais de zoológicos porque é difícil repor as espécies raras e porque eles apresentam potencial econômico, perdas sentimentais e potencial risco à saúde pública (MICHEL *et al.*, 2003). Em relação ao diagnóstico

da tuberculose em antas, na maioria dos casos, a confirmação da infecção foi realizada apenas *post-mortem* (STERNBERG *et al.*, 2002; MICHEL *et al.*, 2003). O presente estudo relata a primeira identificação de tuberculose por *Mycobacterium tuberculosis* em *Tapirus terrestris* no Brasil. Após a confirmação da infecção por meio dos exames nas amostras de lavado broncoalveolar, o animal positivo para tuberculose recebeu tratamento específico com a utilização de associação de isoniazida e rifampicina mais pirazinamida, via oral, com duração de seis meses e com melhora dos sinais clínicos. Dessa forma, os exames realizados no lavado broncoalveolar foram de grande importância para o estabelecimento de um diagnóstico *ante-mortem* da tuberculose nas antas e possibilitaram o tratamento precoce do animal doente, contribuindo para a preservação das espécies silvestres.

No presente estudo, ocorreu o crescimento de bacilos da tuberculose em meio de cultura apenas nas amostras do animal macho, enquanto que não houve crescimento nas amostras de lavado broncoalveolar da fêmea, que foi primeiramente detectável para amplificação por PCR na secreção nasal inicial. Provavelmente, isso se deve ao fato de que durante a coleta de lavado broncoalveolar da fêmea, não havia bacilos em quantidade suficiente para o cultivo, ou eles não estavam mais viáveis na amostra. Além disso, não houve visualização na baciloscopia, provavelmente porque é um método menos sensível que o cultivo bacteriano, sendo necessário uma quantidade mínima de 5000 a 10000 bacilos / mL na amostra para visualização positiva na baciloscopia, enquanto que para cultivo são necessários apenas uma quantidade mínima de 10 a 100 bacilos viáveis na amostra (BRASIL, 1994).

A PCR realizada diretamente do lavado broncoalveolar não foi detectável, provavelmente em razão da menor quantidade de material genético nas amostras provenientes deste tipo de coleta e da grande quantidade de células inflamatórias na amostra, que tornaram inadequada a extração do material genético. No entanto, as amostras do cultivo bacteriano foram positivas para o método de tipificação baseado na PCR, possibilitando a confirmação da espécie infectante como *M. tuberculosis*, segundo HUARD *et al.* (2003). O material isolado do cultivo bacteriano, provavelmente por apresentar grande quantidade de microrganismos na amostra, foi mais adequado para métodos menos sensíveis de biologia molecular, como a tipificação por PCR. Deste modo, para o diagnóstico molecular dos casos suspeitos

de tuberculose na vida silvestre é essencial a associação de PCR aplicada ao lavado broncoalveolar e ao cultivo bacteriano, fornecendo assim uma poderosa ferramenta para auxiliar no estudo da transmissão espacial, temporal e entre espécies desse agente (MICHEL *et al.*, 2006).

As *T. terrestris* estudadas nasceram no próprio zoológico, sendo filhos de animais também residentes no local, que apresentavam histórico de problemas respiratórios e contato com outros animais que vieram a óbito com suspeita de tuberculose. Descobrir como ocorreu a infecção inicial é muito difícil, pois há histórico de problemas respiratórios nas antas há muitos anos no mesmo recinto e os exames realizados até o momento não haviam sido conclusivos para tuberculose. Apesar da espécie de micobactéria encontrada nos animais ser primariamente um patógeno humano, não se pode identificar quem transmitiu a doença a esses animais. Como nenhum funcionário atualmente apresenta a doença na forma ativa, acredita-se que a doença pode ter sido transmitida por funcionários antigos, que não façam parte do corpo atual, ou até mesmo por visitantes do zoológico que podem ter um contato próximo com esses animais nos recintos de exposição. Ainda, algum animal pode ter sido infectado antes da sua chegada ao zoológico e quando locado no mesmo recinto, transmitiu a doença aos demais.

Em relação aos funcionários reagentes à tuberculinização, é provável que eles tenham adquirido a infecção fora do zoológico, pois embora evidências de transmissão de seres humanos para animais de *M. tuberculosis* tenha sido descrita, existe pouca documentação de transmissão zoonótica para humanos (OH *et al.*, 2002). No entanto, como rotas de transmissão entre as espécies não foram comprovadas, é necessária a continuidade da vigilância para fontes de transmissão. Dessa forma, após a identificação do agente da tuberculose nas antas, os tratadores passaram a manejar esses animais com a utilização de equipamentos de proteção individual, para evitar a transmissão da doença.

Um fator que pode influenciar a emergência da doença é o número de seres humanos em contato com esses animais silvestres, levando a um aumento do nível de *M. tuberculosis* sendo disseminado no ambiente, resultando na infecção para a população silvestre (ALEXANDER *et al.*, 2002). Maior atenção tem sido proporcionada ao potencial zoonótico de doenças emergentes na população silvestre e o risco que eles representam para a saúde humana. Menor atenção, no

entanto, tem sido dada para o inverso, que seria a possibilidade do risco de doenças que os seres humanos podem transmitir para a vida silvestre (ALEXANDER *et al.*, 2002). Dessa forma, a pesquisa é essencial para uma melhor compreensão da epidemiologia de *M. tuberculosis* em animais silvestres.

#### 4.5. CONCLUSÕES

A interpretação conjunta dos testes laboratoriais foi essencial para o diagnóstico definitivo da tuberculose nas antas. A cultura microbiológica mostrou-se um método sensível, porém o crescimento das colônias é lento e o resultado pode demorar de 40 a 60 dias. A obrigatoriedade da presença de microrganismos viáveis na amostra foi outro fator limitante, pois impossibilita o uso em amostras com os agentes inativados. A PCR mostrou-se específica, rápida e capaz de detectar o agente em amostras biológicas *ante-mortem* das antas no sistema IS6110. Embora a tipificação por PCR ainda dependa de cultura prévia, o método foi capaz de identificar especificamente a espécie de micobactéria envolvida.

Metodologias de coleta de amostras, principalmente *ante-mortem* devem ser padronizadas para animais silvestres de cativeiro, em particular para antas, para permitir a possibilidade de um tratamento eficaz. O presente estudo evidencia a possibilidade da transmissão da tuberculose entre seres humanos e animais silvestres e enfatiza a importância de adesão a medidas rígidas de controle de infecção durante o manejo dos animais. Aconselha-se inclusive a realização de exames periódicos nos animais e funcionários para manutenção da saúde em ambientes de trabalho.

As populações silvestres suscetíveis podem ser negativamente afetadas pelo aumento da exposição a seres humanos e seus patógenos. Uma melhor compreensão dessas dinâmicas da transmissão de doenças entre seres humanos e a vida silvestre é essencial tanto para o desenvolvimento de programas efetivos de saúde pública como para a manutenção e preservação das espécies silvestres em cativeiro.

## 4.6. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, K. A.; PLEYDELL, E.; WILLIAMS, M. C.; LANE, E. P.; NYANGE, J. F. C.; MICHEL, A. L. *Mycobacterium tuberculosis*: An Emerging Disease of Free-Ranging Wildlife. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 598-601, 2002.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; GALÁN, J. C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SÚAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1263–1273, 1999.

BIAVA, J. S.; GONÇALVES, R. C.; JAVOROUSKI, M. L.; BONAT, M.; PASQUALI, O. L.; BIONDO, A. W.; VILANI, R. G. O.; MURAKAMI, P. S.; TELLES, J. E. Q. Broncoalveolar lavage (BAL) technique in two tapirs (*Tapirus terrestris*) for diagnosis of tuberculosis. In: Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens – ABRAVAS, 16, 2007, São Paulo. **Anais do congresso “Todos pela Conservação”**, São Paulo, Brasil, 2007. n. 323, p. 53.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF, 1994.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5.ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I. ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1305–1314, 2003.

EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 5, p. 977-81, 1990.

HUARD, R. C.; LAZZARINI, L. C. O.; BUTLER, W. R.; SOOLINGEN, D.; HO, J.L. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 4, p. 1637-1650, 2003.

MICHALAK, K.; AUSTIN, C.; DIESEL, S.; BACON, M. J.; ZIMMERMAN, P.; MASLOW, J. N. *Mycobacterium tuberculosis* infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants. **Emerging Infectious Diseases**. v. 4, p. 283–287, 1998.

MICHEL, A. L.; VENTER, L.; ESPIE, I. W.; COETZEE, M. L. *Mycobacterium tuberculosis* infections in eight species at the national zoological gardens of South Africa, 1991–2001. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 4, p. 364–370, 2003.

MICHEL, A. L.; BENGIS, R. G.; KEET, D. F.; HOFMEYR, M.; KLERK, L. M.; CROSS, P. C.; JOLLES, A. E.; COOPER, D.; WHYTE, I. J.; BUSS, P.; GODFROID, J. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: Implications and challenges. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 91–100, 2006.

MONTALI, R. J.; MIKOTA, S. K.; CHENG, L. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 20, p. 291–303, 2001.

NAKATANI, S. M. Detecção Molecular do *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* em Amostras de Sangue de Pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Curitiba, 2002. 96 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. vol. 2, 5. ed. Baltimore-London: The Johns Hopkins University Press, 1991, p. 1101-1102.

OH, P.; GRANICH, R.; SCOTT, J.; SUN, B. JOSEPH, M.; STRINGFIELD, C.; THISDELL, S.; STALEY, J.; WORKMAN-MALCOLM, D.; BORENSTEIN, L.; LEHNKERING, E.; RYAN, P.; SOUKUP, J.; NITTA, A.; FLOOD, J. Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 8, n. 11, p. 1290-1293, 2002.

PATE, M.; SVARA, T.; GOMBAC, M.; PALLER, T.; ZOLNIR-DOVC, M.; EMERSIC, I.; PRODINGER, W. M.; BARTOS, M.; ZDOVC, I.; KRT, B.; PAVLIK, I.; CVETNIC, Z.; POGACNIK, M.; OCEPEK, M. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 53, p. 387–392, 2006.

RYAN, T. J.; LIVINGSTONE, P. G.; RAMSEY, D. S. L.; LISLE, G. W.; NUGENT, G.; COLLINS, D. M.; BUDDLE, B. M. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock:

the experience from New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v. 112 p. 211–219, 2006.

STERNBERG, S.; BERNODT, K.; HOLMSTRÖM, A.; RÖKEN, B. Survey of tuberculin testing in swedish zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 4, p. 378–380, 2002.

VAN SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; HAAS, P. E.; HERMANS, P. W.; KOEDAM, M. A.; TEPPEMA, K. S.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L. M.; VAN EMBDEN, J. D. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 1236–1245, 1997.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. A tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* apresenta grande importância para saúde pública, saúde animal e produção animal. A implantação de programas de controle e erradicação eficazes é de extrema importância para reduzir a prevalência e a incidência da doença no Brasil.

2. Existe pouca informação a respeito da tuberculose em animais silvestres no Brasil. Há necessidade de maior atenção em relação à existência e a transmissão da tuberculose, causada tanto por *M. bovis* quanto por *M. tuberculosis*, entre espécies domésticas, silvestres e os seres humanos.

3. A PCR mostrou-se específica, rápida e capaz de detectar o agente em amostras biológicas *ante* e *post-mortem* dos quatis e antas no sistema IS6110. Embora a tipificação por PCR ainda dependa de cultura prévia, o método foi capaz de identificar especificamente a espécie de micobactéria envolvida. A interpretação conjunta dos testes laboratoriais foi essencial para o diagnóstico definitivo da tuberculose nas espécies animais estudadas.

4. O diagnóstico de *M. bovis* em quatis alerta para a importância desta doença em saúde animal e saúde pública, pois a crescente proximidade de pessoas, animais domésticos e silvestres facilita o contato e a transmissão da doença entre estas espécies.

5. A detecção de *M. tuberculosis* em antas alerta para a importância desta doença em populações silvestres suscetíveis, que podem ser afetadas pelo aumento da exposição a seres humanos e seus patógenos. Uma melhor compreensão dessas dinâmicas da transmissão de doenças entre seres humanos e a vida silvestre é essencial tanto para o desenvolvimento de programas efetivos de saúde pública como para a manutenção e preservação das espécies silvestres em cativeiro.

## ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

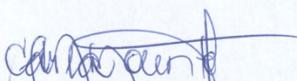
### CERTIFICADO

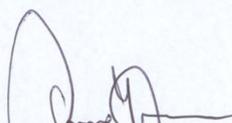
Certificamos que o protocolo no. 020/2006, referente ao projeto "Diagnóstico molecular das subespécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e identificação do *Mycobacterium avium* em amostras supeitas humanas e animais", sob a responsabilidade de Patrícia Sayuri Murakami, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 29 de junho de 2006. Este certificado refere-se somente ao uso de animais não-humanos e expira em 31 de julho de 2007.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 020/2006, regarding the project "Molecular diagnosis of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex subspecies and identification of *Mycobacterium avium* in human and animal suspect samples", in charge of Patrícia Sayuri Murakami, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Parana, Southern Brazil) during session on June 29, 2006. This certificate refers exclusively to the use of non-human animals and expires on July 31, 2007.

Curitiba, 29 de junho de 2006

  
Carla Forte Maiolino Molento  
Presidente

  
Rogério Ribas Lange  
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias

## ANEXO 2: Aprovação do projeto inicial na Fundação Araucária



Ato da Diretoria Executiva 98/2006  
Chamada de Projetos 06/2005

### PROGRAMA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA O SUS

A Diretoria Executiva da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná torna público o resultado da análise e aprovação dos projetos de auxílio financeiro encaminhados em atendimento à Chamada de Projetos 06/2005 – “Projetos de Pesquisa para o SUS – Gestão Compartilhada em Saúde”, realizada pelo Comitê Gestor do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Ciência e Tecnologia para o SUS.

Prof.	Instit.	Título do Projeto	Proponente
<b>DOENÇAS CRÔNICAS DEGENERATIVAS</b>			
9032	PUC-PR	Avaliação da relação neutrófilos/linfócitos no atendimento inicial de pacientes com suspeita de síndrome coronariana aguda: Podemos melhorar a custo-efetividade nas Unidades de Dor Torácica utilizando métodos mais simples?	José Rocha Faria Neto
8442	UEM	Avaliação da assistência ao portador de hipertensão arterial na macroregião Noroeste do Paraná	Maria José Scochi
<b>DOENÇAS INFECCIOSAS E NÃO-INFECCIOSAS</b>			
7536	UEL	Influência da deleção de 32PB (32) do gene OCR5 na evolução dinâmica da <i>Leishmaniose tegumentar americana</i> na região Norte do Paraná	Maria Angélica Ehara Watanabe
8843	UEM	Centro Interdisciplinar de diagnóstico e acompanhamento da paracoccidiodomicose	Terezinha Estivalet Svidzinski
8891	UEM	Monitoramento da resistência de antimicrobianos em amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes com infecção hospitalar	Maria Cristina Bronharo Tognim
8654	UEM	Influência de polimorfismos genéticos no desenvolvimento das formas clínicas de hanseníase no Estado do Paraná	Jeanne Eliete Lagula Visentainer
8970	UEM	Caracterização fenotípica e genotípica de leveduras isoladas de pacientes internados em UTI de hospitais de Maringá	Eliana Valéria Patussi
9040	UFPR	Diagnóstico e epidemiologia molecular das subespécies do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e identificação do <i>Mycobacterium avium</i> em amostras suspeitas humanas e animais.	Alexander Welker Biondo
8890	UEL	Diagnóstico molecular e caracterização fenotípica de determinantes de virulência de leveduras do gênero <i>Candida</i> isoladas de pacientes do HU de Londrina	Márcia Cristina Furlaneto
<b>POLÍTICAS PÚBLICAS E QUALIFICAÇÃO DA ATENÇÃO À SAÚDE - QualiSUS</b>			
9026	UTFPR	Avaliação de doses de radiação e procedimento radiográfico em hospitais do Paraná	Hugo Reuters Schein
9018	UFPR	Prevalência das enteroparasitoses humanas em municípios da região metropolitana de Curitiba	Rogério Lutz Kopp
6238	UEM	Implementação de métodos moleculares para estudos de bactérias multiresistentes: Contribuição para implementação de vigilância epidemiológica em infecções hospitalares	João Bedendo
8921	Unioeste	Caracterização fenotípica e genotípica de leveduras do gênero <i>Candida</i> isoladas de pacientes internados no HU do Oeste do Paraná	Rinaldo Ferreira Gandra

## ANEXO 3: Solicitação de Autorização do Ibama (em trâmite)

Extrato da solicitação					
<b>RESSALVA:</b> Este extrato refere-se ao registro de solicitação de autorização no sisbio e não tem caráter autorizador.					
Dados básicos					
Nº da solicitação: <b>10719</b>					
Tipo da solicitação: <b>Autorização para atividades com finalidade científica</b>					
Situação: <b>Solicitação devolvida para correção</b>					
Título: <b>Identificação molecular das subespécies do Complexo Mycobacterium tuberculosis em amostras suspeitas humanas e animais</b>					
A solicitação envolve espécie ameaçadas de extinção: <b>SIM</b>					
Instituição: <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ</b>					
Dados do pesquisador					
Pesquisador: <b>Alexander Welker Biondo</b>					
CPF: <b>104.159.508-56</b>					
Endereço: <b>Rua Odilon de Santa Rita Borba, nº 65</b>					
Bairro: <b>Bacacheri</b>					
Cidade: <b>CURITIBA- PR</b>					
CEP: 82510-260					
Fone: 3357-1935					
FAX: 3350-5623					
E-mail: abiondo@uiuc.edu					
MEMBROS DA EQUIPE					OPERAÇÃO
Nº	Nome do pesquisador	Nacionalidade	Função	Situação	
1	Marcelo Bonat	Brasileira	manejo dos animais e coleta de amostras	Estado inicial	<a href="#">Ver currículo</a>
2	Oneida Lacerda	Brasileira	manejo dos animais e coleta de amostras	Estado inicial	<a href="#">Ver currículo</a>
3	Patrícia Sayuri Murakami	Brasileira	coleta e processamento de amostras	Submetido para análise	<a href="#">Ver currículo</a>
4	Ricardo Guilherme D´Otaviano de Castro Vilani	---	manejo dos animais e coleta de amostras	Submetido para análise	<a href="#">Ver currículo</a>
5	Sueli Massumi Nakatani	Brasileira	processamento de amostras	Estado inicial	<a href="#">Ver currículo</a>
ITEM(S) INCLUÍDOS(S) NA SOLICITAÇÃO					

<u>Nº</u>	<u>Descrição do item</u>	<u>Tipo do item</u> ▼	<u>Situação</u>
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades	Submetido para análise
2	Recebimento de amostras biológicas provenientes do exterior	Atividades	Submetido para análise
3	Envio de material biológico ao exterior	Atividades	Submetido para análise

**LOCAL(IS) DA PESQUISA**

<u>Nº</u>	<u>Local da pesquisa</u>	<u>Bioma</u>	<u>Município</u>	<u>UF</u>	<u>Situação</u>
1	Zoológico Municipal de Curitiba	Mata Atlantica	CURITIBA	PR	Submetido para análise
2	Centro de Triagem de Animais Silvestres	Mata Atlantica	TIJUCAS DO SUL	PR	Submetido para análise

**TÁXON(S) X ATIVIDADES INCLUÍDO(S) NA SOLICITAÇÃO**

<u>Nº</u>	<u>Táxon</u> ▼	<u>Classificação superior</u>	<u>Qtd Prevista</u>	<u>Atividade</u>	<u>Situação</u>
1	Especie Cebus apella	Primatas	---	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sujeito à liberação automatizada
2	Especie Cebus apella	Primatas	---	Envio de material biológico ao exterior	Sujeito à liberação automatizada
3	Especie Nasua nasua	Carnívoros	---	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sujeito à liberação automatizada
4	Especie Nasua nasua	Carnívoros	---	Envio de material biológico ao exterior	Sujeito à liberação automatizada
5	Especie Nasua nasua	Carnívoros	---	Recebimento de amostras biológicas provenientes do exterior	Submetido para análise
6	Familia Tayassuidae	Outros mamíferos	---	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sujeito à liberação automatizada
7	Familia Tayassuidae	Outros mamíferos	---	Envio de material biológico ao exterior	Sujeito à liberação automatizada
8	Genero Tapirus	Outros mamíferos	---	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sujeito à liberação automatizada

9	Genero Tapirus	Outros mamíferos	---	Envio de material biológico ao exterior	Sujeito à liberação automatizada
10	Genero Tapirus	Outros mamíferos	---	Recebimento de amostras biológicas provenientes do exterior	Submetido para análise

#### TÁXONS X MATERIAIS, MÉTODOS, AMOSTRAS BIOLÓGICAS DA SOLICITAÇÃO

<u>Nº</u>	<u>Grupo taxonômico</u>	<u>Descrição</u>	<u>Tipo</u>	<u>Situação</u>
1	Carnívoros	Secreções	Amostras biológicas	Sujeito à liberação automatizada
2	Outros mamíferos	Secreções	Amostras biológicas	Sujeito à liberação automatizada
3	Primatas	Secreções	Amostras biológicas	Sujeito à liberação automatizada
4	Carnívoros	Órgãos	Amostras biológicas	Sujeito à liberação automatizada
5	Outros mamíferos	Órgãos	Amostras biológicas	Sujeito à liberação automatizada
6	Primatas	Órgãos	Amostras biológicas	Sujeito à liberação automatizada

#### DESTINO(S) DO(S) MATERIAL(IS) BIOLÓGICO(S)

<u>Nº</u>	<u>Destino</u> ↓	<u>Tipo do destino</u>	<u>Situação</u>
1	---	laboratório de pesquisa	Estado inicial
2	Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti	Laboratório Estadual de Referência	Estado inicial
3	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	Laboratório de Pesquisa	Submetido para análise

#### INSTITUIÇÃO(ÕES) PARTICIPANTE(S)

<u>Nº</u>	<u>Nome da instituição</u> ↓	<u>Participação</u>	<u>Situação</u>
1	Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti - CDME	Processamento das amostras	Estado inicial
2	Pontifícia Universidade Católica - PUC-PR	Animais e Amostras	Estado inicial
3	Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Curitiba	Animais e Amostras	Estado inicial
4	Weill Medical College of Cornell University	Contraprova diagnóstica	Estado inicial

#### CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

<u>Nº</u>	<u>Descrição da atividade</u>	<u>Data início</u> ↓	<u>Data Fim</u>	<u>Situação</u>
1	Aquisição de Equipamentos e Materiais	01/07/2007	30/10/2007	Submetido para análise
2	Capacitação e Optimização da Técnica de Diagnóstico	01/07/2007	30/01/2008	Submetido para análise
3	Coleta e Processamento das Amostras	01/07/2007	01/06/2008	Submetido para

4	Resultados e Publicações	01/07/2007	01/07/2008	análise Submetido para análise
5	Análise dos dados	01/08/2007	30/06/2008	Submetido para análise

#### ASSUNTOS ESTUDOS DA SOLICITAÇÃO

<u>Nº</u>	<u>Descrição do assunto</u> ↕	<u>Situação</u>
1	Bacteriologia	Submetido para análise
2	Biologia Molecular	Submetido para análise
3	Medicina Veterinária	Submetido para análise
4	Microbiologia	Submetido para análise

#### DADOS BÁSICOS DA SOLICITAÇÃO

<u>Nº</u>	<u>Nome do campo</u>	<u>Descrição</u>	<u>Situação</u>
1	Introdução/Justificativa	<p>A tuberculose é uma infecção crônica grave causada por microrganismos do Complexo Mycobacterium tuberculosis (CMT), que afeta mamíferos do mundo inteiro, inclusive os humanos (HUARD et al., 2003; PATE et al., 2006). Os membros clássicos do CMT são o M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum e M. microti, que apresentam uma alta homogeneidade na seqüência de nucleotídeos, apesar de variarem em certos aspectos como patogenicidade e preferência de hospedeiros (HUARD et al., 2003). Recentemente, três novas espécies foram introduzidas no CMT: M. canetti (VAN SOOLINGEN et al., 1997), M. pinnipedii (COUSINS et al., 2003) e M. caprae (ARANAZ et al., 1999).</p> <p>Acredita-se que a tuberculose seja mais comum em animais silvestres de cativeiro que os de vida livre, pois geralmente vivem em maior proximidade com humanos e animais domésticos, possibilitando a transmissão de doenças entre essas espécies (MICHEL et al., 2003; PATE et al., 2006). Além disso, muitas vezes esses animais vivem sob intenso estresse, alta densidade populacional e condições inadequadas de nutrição e higiene, tornando-os mais suscetíveis a infecções. Nesses locais, sinais vagos e não específicos de tuberculose podem passar despercebidos em animais que não são facilmente manejáveis (STERNBERG et al., 2002). Ainda, contato íntimo, áreas comuns para alimentação e fornecimento de água de beber, dificuldade em desinfetar adequadamente áreas externas e a exposição aos humanos favorecem a manutenção e a sobrevivência da tuberculose animais em cativeiro (MICHEL et al., 2003).</p> <p>O impacto da tuberculose nas populações silvestres pode ainda ter significância econômica e epidemiológica (O'BRIEN et al., 2004; PATE et al., 2006) quando a espécie é um reservatório de infecção para animais domésticos (BIET et al., 2005; CORNER, 2006), prejudicando programas de erradicação e controle da tuberculose (COLEMAN &amp; COOKE, 2001; ALEXANDER et al., 2002).</p> <p>A tuberculose em animais silvestres, também pode ter importância em saúde pública (BIET et al., 2005; CORNER, 2006), se eles são uma fonte de infecção para profissionais ou tratadores que lidam com animais silvestres (GORTAZAR et al., 2005). Entretanto, aparentemente existem poucas ações que tratam da segurança ocupacional para tuberculose zoonótica, principalmente em relação à exposição enfrentada pelos profissionais que lidam com animais silvestres (O'BRIEN et al., 2004).</p> <p>Dessa forma, realizar o diagnóstico da tuberculose nos animais silvestres é de extrema importância para saúde pública, saúde animal e epidemiologia. Os testes diagnósticos são ferramentas essenciais para controle da doença (RYAN et al., 2006), no entanto, os métodos atualmente utilizados para o diagnóstico não identificam diferenciadamente as espécies do CMT e podem ainda resultar em falso negativos ou inconclusivos. Além disso, os recursos são muito limitados, em particular no diagnóstico da doença post-mortem ou na detecção do agente nos produtos e secreções animais. Métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) oferecem uma alternativa interessante para classificação e identificação dessas bactérias (HUARD et al., 2003). O método de detecção por PCR é rápido, específico e pode ser detectado mesmo após a inativação do agente. Desse modo, o presente projeto objetiva estudar uma técnica para diagnóstico molecular aplicada a animais silvestres de cativeiro, que diferencie as diversas subespécies do CMT. A técnica é utilizada em conjunto com</p>	Alterado

		baciloscopia e cultivo bacteriano para uma identificação mais precisa do agente causador da tuberculose.	
2	Objetivo geral	O presente projeto tem como objetivo geral atualizar e aprofundar conhecimentos sobre a tuberculose em animais silvestres em seus vários aspectos, assim como suas implicações na área de saúde pública e saúde animal, com identificação dos microorganismos de forma molecular pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Ainda, contribuir com um método diagnóstico eficaz para buscar alternativas mais específicas de tratamento e possibilitar o desenvolvimento de um perfil epidemiológico da doença, identificando quais as espécies de maior prevalência.	Alterado
3	Objetivos específicos	Como objetivo específico, será padronizado método de diagnóstico molecular em laboratórios de referência do Estado do Paraná para compor a rotina de identificação da tuberculose em humanos, animais domésticos e animais silvestres. Será avaliada a eficácia de um método capaz de identificar isoladamente as espécies do Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , incluindo o <i>M. tuberculosis</i> , o <i>M. bovis</i> , o <i>M. africanum</i> , o <i>M. microti</i> , o <i>M. canetti</i> e o <i>M. caprae</i> .	Alterado
4	Materiais/Métodos	O presente estudo será realizado com amostras de animais silvestres de zoológicos e centros de triagem de animais silvestres. Serão realizadas radiografias torácicas dos animais suspeitos, bem como tuberculinação intradérmica simples dos animais com 0,1mL de tuberculina bovina. Também será realizada tuberculina nos funcionários em contato com os animais suspeitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Para os testes laboratoriais, a amostra ante-mortem utilizada será de lavado broncoalveolar. Após sedação e anestesia, será utilizado endoscópio para auxiliar a introdução da sonda até os brônquios. Uma quantidade de 10 mL a 60 mL de solução fisiológica será infundida com seringas descartáveis e aspirada novamente. Caso algum animal venha a óbito em decorrência da tuberculose ou se o protocolo estabelecido na instituição para evitar o risco de transmissão for a eutanásia dos animais, será realizada a necropsia e serão coletados fragmentos de pulmão e linfonodos para realização de exames laboratoriais. Os animais que não forem eutanasiados serão submetidos a tratamento com antibióticos específicos. As amostras de lavado broncoalveolar e os produtos de necropsia armazenados em solução fisiológica serão enviados refrigerados para cultivo bacteriano, baciloscopia e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em laboratórios de referência do Estado do Paraná. Para cultivo bacteriano, o material será descontaminado com solução de NaOH 4%, neutralizado com solução de HCl 1,0 N, e os sedimentos semeados em tubos com meio de cultura de Lowenstein-jensen. As culturas serão incubadas a 37°C e controladas semanalmente para verificar o crescimento de colônias durante 40 a 60 dias. por baciloscopia das amostras em coloração de Ziehl-neelsen, segundo Manual de Bacteriologia da Tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994). O material isolado proveniente dos cultivos positivos para micobactérias, será utilizado para realização de PCR específica para a diferenciação de espécies do CMT utilizando sete pares de oligonucleotídeos que amplificam as regiões 16S rRNA, Rv0577, IS1561, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8, e Rv3120, formando um painel de identificação das espécies segundo método descrito por HUARD et al. (2003), permitindo a classificação do agente em <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. canetti</i> ou <i>M. caprae</i> . Esses oligonucleotídeos são baseados em regiões de diferenças genômicas, consistindo em segmentos de DNA que estão presentes em <i>M. tuberculosis</i> , mas diferenciadamente deletados em vários outros membros do CMT. As amostras de cultura serão extraídas por técnica de quente-frio, que consiste de três ciclos de 30 minutos a 94°C e 30 minutos a -20°C para inativação do agente e liberação do material genético. O programa de amplificação consistirá em 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C e 35 ciclos de amplificação de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C, 1 minuto a 72°C e um estágio final a 72°C por 10 minutos. O padrão dos produtos de amplificação das reações será visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio. O resultado será visualizado com transiluminador ultravioleta e fotografado com sistema de fotodocumentação. A UFPR possui Convênio com a Weill Medical College, Cornell University, Nova Iorque, EUA, sob a responsabilidade do Prof. Dr. John Ho, autoridade internacional no assunto. Este Convênio pressupõe o recebimento de kits doados para extração de DNA, e o envio de amostras biológicas para diagnóstico. Deste modo, dentro do convênio técnico, as amostras positivas na PCR, a exemplo do que já é feito com amostras humanas e bovinas, poderão ser enviadas para confirmação diagnóstica por seqüenciamento para a Divisão de Medicina Internacional e Doenças Infecciosas da Cornell University. Serão enviados produtos obtidos na PCR e não o genoma completo extraído, de modo a não caracterizar o envio de amostra biológica do acervo do banco genético nacional, nem tampouco amostra biológica infectante.	Alterado
5	Resultados esperados	Com a pesquisa espera-se padronizar um método molecular eficaz para a identificação das espécies de micobactérias infectantes em animais silvestres de cativeiro de zoológicos e centros de triagem de animais silvestres. Além disso, espera-se obter informações a respeito da existência ou não de tuberculose nesses animais e de acordo com a espécie infectante, procurar estabelecer a forma de transmissão prevalente nos locais pesquisados.	Alterado
6	Referências bibliográficas	ALEXANDER, K.A.; PLEYDELL, E.; WILLIAMS, M.C.; LANE, E.P.; NYANGE, J.F.C.; MICHEL, A.L. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : An Emerging Disease of Free-Ranging Wildlife. <i>Emerging Infectious Diseases</i> . 8(6):598-601, 2002. ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; GALÁN, J.C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SÚAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> subsp. <i>caprae</i> subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex isolated from goats in Spain. <i>International Journal of Systematic Bacteriology</i> , 49:1263-1273, 1999. BIET, F.; BOSCHIROLI, M.L.; THOREL, M.F.; GUILLLOTEAU, L.A. Zoonotic aspects of <i>Mycobacterium bovis</i> and <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> complex (MAC). <i>Veterinary Research</i> , 36:411-436, 2005. COLEMAN, J.D.; COOKES, M.M. <i>Mycobacterium bovis</i> infection in wildlife in New Zealand. <i>Tuberculosis</i> , 81(3):191-202, 2001.	Alterado

CORNER,L.A.L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112:303-312, 2006.

COUSINS,D.V.;BASTIDA,R.;CATALDI,A.;QUSE,V.;REDROBE,S.;DOW,S.;DUIGNAN,P.;MURRAY,A.;DUPONT,C.;AHMED,N.;COLLINS,D.M.;BUTLER,W.R.;DAWSON,D.;RODRIGUEZ,D.;LOUREIRO,J.;ROMANO,M.I.ALITO,A.;ZUMARRAGA,M.;BERNARDELLI,A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:1305-1314, 2003.

GORTAZAR,C.;VICENTE,J.;SAMPER,S.;GARRIDO,J.M.;FERNÁNDEZ-DE-MERA,I.G.;GAVÍN,P.;JUSTE,R.A.;MARTÍN,C.;ACEVEDO,P.;DE LA PUENTE,M.;HÖFLE,U. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary Research*, 36:43-52, 2005.

HUARD,R.C.;LAZZARINI,L.C.O.;BUTLER,W.R.;SOOLINGEN,D.;HO,J.L. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(4):1637-1650, 2003.

MICHEL,A.L.;VENTER,L.;ESPIE,I.W.;COETZEE,M.L. *Mycobacterium tuberculosis* infections in eight species at the national zoological gardens of South Africa, 1991-2001. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34(4):364-370, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5.ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2.ed. Rio de Janeiro, 1994.

O` BRIEN,D.J.;YEREB,D.J.;COSGROVE,M.K.;CARLSON,E.S.;SCHMITT,S.M.;WILKINS,M.J. From the field: an occupational safety program for wildlife professionals involved with bovine tuberculosis surveillance. *Wildlife Society Bulletin*. 32(3):992-999, 2004.

PATE,M.;SVARA,T.;GOMBAC,M.;PALLER,T.;ZOLNIR-DOVC,M.;EMERSIC,I.;PRODINGER,W.M.;BARTOS,M.;ZDOVC,I.;KRT,B.;PAVLIK,I.;CVETNIC,Z.;POGACNIK,M.;OCEPEK,M. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 53:387-392, 2006.

RYAN,T.J.;LIVINGSTONE,P.G.;RAMSEY,D.S.L.;LISLE,G.W.;NUGENT,G.;COLLINS,D.M.;BUDDLE,B.M. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Veterinary Microbiology*, 112:211-219, 2006.

STERNBERG,S.;BERNODT,K.;HOLMSTRÖM,A.;RÖKEN,B. Survey of tuberculin testing in swedish zoos. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33(4):378-380, 2002.

VAN SOOLINGEN,D.;HOOGENBOEZEM,T.;HAAS,P.E.;HERMANS,P.W.;KOEDAM,M.A.;TEPPEMA,K.S.;BRENNAN,P.J.;BESRA,G.S.;PORTAELS,F.;TOP,J.;SCHOULS,L.M.;VAN EMBDEN,J.D. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47:1236-1245, 1997.

## ANEXO 4: Resumos apresentados no XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens – ABRAVAS, 2007



XXXI CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE DE ZOOLOGÍCOS DO BRASIL - SZB  
XIV CONGRESSO ANUAL DA "ASOCIACION LATINOAMERICANA DE PARQUES ZOOLOGÍCOS E ACUÁRIOS" - ALPZA  
XVI ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS - ABRAVAS

### MOLECULAR DIAGNOSIS OF *Mycobacterium tuberculosis* IN TAPIRS (*Tapirus terrestris*) FROM THE CURITIBA ZOO, PARANÁ

Patrícia Sayuri Murakami<sup>1</sup>; Manoel Lucas Javorouski<sup>2</sup>; Marcelo Bonat<sup>2</sup>; **Oneida Lacerda<sup>2</sup>**; Sonia Regina Brockelt<sup>3</sup>; Sonia Maria Biesdorf<sup>4</sup>; Sueli Massumi Nakatani<sup>3</sup>; Irina Nastassja Riediger<sup>3</sup>; Renata Benício Neves Fuverki<sup>1</sup>; Janaina Biava<sup>5</sup>; Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani<sup>1</sup>; Ivan Roque de Barros Filho<sup>1</sup>; Luiz Felipe M. Cavazzani<sup>1</sup>; Alexander Welker Biondo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná. Rua dos Funcionários 1.540, Curitiba, PR, 80035-050, [abiondo@uiuc.edu](mailto:abiondo@uiuc.edu); <sup>2</sup>Zoológico Municipal de Curitiba; <sup>3</sup>Laboratório Central do Estado – LACEN-PR; <sup>4</sup>Centro Diagnóstico Marcos Enrietti – CDME; <sup>5</sup>Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP.

The *Mycobacterium tuberculosis* Complex includes *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti* and its diagnosis may be difficult in wild animals as there is no standard protocol for these species. Moreover, diagnosis in some wild species may not be efficient using traditional methods. Clinical diagnosis, particularly in tapirs (*Tapirus terrestris*), may also be challenging since tuberculin tests are unclear and clinical signs varies from non-specific signs to fast breathing, respiratory dyspnea and presence of granulomatous injuries. In June 2006, two of the four tapirs of the Curitiba Zoo presented episodes of chronic non-productive cough and discrete hyperthermia. Bacterial culture was carried out from bilateral serous samples obtained by nasal swabs in two tapirs, and polimerase chain reaction (PCR) performed on extracted DNA from original sample. Although culture was non-productive and presented only growth of opportunist bacteria, PCR was weakly positive for one of the samples following a general protocol for detection of *M. tuberculosis* Complex. Unfortunately, extracted DNA was not enough for more specific PCR protocols. New collection was scheduled in November, 2006 and included sedation, anesthesia and endoscopy of the same two tapirs with samples obtained by bronchoalveolar lavage (BAL). Samples were placed in ice and taken to the Marcos Enrietti Center of Diagnosis (CDME) and Central Laboratory of Paraná State (LACEN-PR) and submitted to culture, bacilloscopy and PCR. Bacilloscopy and PCR were performed directly from BAL and resulted negative for both animals. All bacterial culture but one were negative, after 40 days of incubation, and presented excessively bacterial contamination. PCR in this positive culture sample showed positive results for *M. tuberculosis* Complex and also for *Mycobacterium tuberculosis*, with amplicon of predicted size. In our opinion, negative PCR results obtained from BAL samples were probably caused by inflammatory cells and bacterial contamination in these samples. Although *Mycobacterium tuberculosis* in zoo animals is known to be caused by human to animal infection and employees must be screened for the disease, infected animals may serve as reservoirs and, associated to environmental contamination, may frustrate effective disinfection. Therefore, specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* in these two tapirs was very important for zoonoses and public health since they may be source of infection to other animals, employees and visitors while sharing common areas, particularly immuno-compromised individuals such as children and aged adults.

Financial support: Fundação Araucária (funding), UFPR-TN and Capes (fellowships).



XXXI CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL - SZB  
 XIV CONGRESSO ANUAL DA "ASOCIACION LATINOAMERICANA DE PARQUES ZOOLOGICOS E ACUARIOS" - ALPZA  
 XVI ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS - ABRAVAS

### BRONCOALVEOLAR LAVAGE (BAL) TECHNIQUE IN TWO TAPIRS (*Tapirus terrestris*) FOR DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

Janaina Socolovski Biava<sup>1</sup>; Roberto Calderon Gonçalves<sup>1</sup>; Manoel Lucas Javorouski<sup>2</sup>; Marcelo Bonat<sup>2</sup>; Oneida Lacerda Pasquali<sup>2</sup>; Alexander Welker Biondo<sup>3</sup>; Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani<sup>3</sup>; Patrícia Sayuri Murakami<sup>3</sup>; José Ederaldo Queiroz Telles<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Clínica Veterinária da FMVZ-UNESP/Botucatu; <sup>2</sup>Zoológico Municipal de Curitiba; <sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária da UFPR – PR; <sup>4</sup>Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas, UFPR-PR. [abiondo@uiuc.edu](mailto:abiondo@uiuc.edu).

Evaluation of bronchoalveolar lavage (BAL) through endoscopy is an important tool for the cytological and microbiological diagnostic of respiratory diseases, however several wild species may not allow its procedure due to possible anatomic differences. The aim of the present study was to perform the BAL technique with endoscopy to tapirs (*Tapirus terrestris*). Two adult tapirs, a male and a female, were clinically examined, both with history of productive coughing and suspicious of tuberculosis, from the Curitiba Zoo, Brazil. Following chemical restraint with azaperone 160 mg plus medetomidine hydrochloride 1 mg IM to first animal and azaperone 160 mg plus meperidine 200 mg IM to second animal, upper and lower respiratory tract were evaluated by nasal endoscopy. The colonoscope (CF-140L, Olympus Co, USA), with 1.80 m length and 12.80 mm external diameter with light source 150 Watts allowed easy access and adequate visualization of respiratory structures and secretions. Samples were obtained near the Carina after infusion of 60 ml of saline solution 0.9%, fractioned to minimize excessive pressure in the alveoli. The introduced fluid was removed by suction with 60 ml syringe properly identified. Following sample aspiration, syringe was detached from the catheter and placed into a polystyrene box with ice, taken to the laboratory where the samples were centrifuged in cytocentrifuge (Revan Cytocentrifuge 2000 D) for 5 minutes. The cellular bottom formed on the glass slide was stained with Schiffer Periodic Acid (PAS), Papanicolaou and Ziehl Nielsen, following standard protocol. Slides were also stained with Diff-quick for differential cell evaluation in microscope (500 cells). Mucopurulent secretion was observed in both upper and lower respiratory tract, including throughout the trachea; tracheal edema near the Carina and hyperemia of main bronchi. High amounts of purulent secretion were expelled by coughing in both animals after the endoscopy. Special stained slides showed predominance of inflammatory cells and bacteria compatible to *Mycobacterium* sp. Obtained samples from BAL were also positive for bacterial culture in both animals and also PCR positive for *Mycobacterium tuberculosis*.

Funding: Fundação Araucária (project), Fapesp and Capes (Masters fellowship).

## ANEXO 5: Resumo aceito para o II Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária

### DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Mycobacterium bovis* EM QUATIS (*Nasua nasua*)

Patrícia S. Murakami<sup>1</sup>, Ricardo G.O.C. Vilani<sup>1,2</sup>, Grazielle C.G. Soresini<sup>2</sup>, Sonia R. Brockelt<sup>3</sup>, Sonia M. Biesdorf<sup>4</sup>, Sueli M. Nakatani<sup>3</sup>, Irina N. Riediger<sup>3</sup>, Renata B. N. Fuverki<sup>1</sup>, Ivan R. de Barros Filho<sup>1</sup>, Alexander W. Biondo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Depto Medicina Veterinária, UFPR; Rua dos Funcionários 1540, Curitiba-PR 80035-050, abiondo@uiuc.edu; <sup>2</sup>CETAS; <sup>3</sup>LACEN-PR; <sup>4</sup>CDME.

**Introdução:** O diagnóstico e controle das micobactérias que compõem o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* torna-se difícil em animais selvagens por não haver um protocolo confiável para estas espécies. Nos quatis (*Nasua nasua*), os estudos sobre prevalência e sinais clínicos da tuberculose são escassos. **Objetivos:** Detectar a presença de *Mycobacterium* spp. em quatis do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), localizado em Tijucas do Sul – PR, com suspeita de infecção, visto que semanas antes um quati do mesmo recinto morreu apresentando lesões pulmonares. **Material e métodos:** Em dezembro de 2006, quatro quatis foram examinados através de contenção com puçás, com posterior sedação e anestesia. Realizou-se radiografia torácica em cada animal; um deles apresentou maior alteração pulmonar com áreas indicativas de lesões por tuberculose, e os demais possuíam nódulos pulmonares mais discretos. Realizou-se lavado broncoalveolar (BAL) e alíquotas deste material foram enviadas ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME) e ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) para cultura bacteriana em meio de Lowenstein-Jensen, baciloscopia e reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi realizada a partir da extração do DNA em amostras de BAL e testou a presença do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* pela região IS6110 e *Mycobacterium avium*. Devido ao risco de transmissão do patógeno para animais e humanos e ausência de recinto de quarentena no local, realizou-se eutanásia com posterior necropsia e amostras de pulmão e linfonodos foram enviadas ao CDME para cultivo e ao LACEN para PCR. **Resultados:** Três animais apresentaram baciloscopia positiva, porém sem crescimento de colônias características de *Mycobacterium* sp., provavelmente porque os bacilos vistos na lâmina já estavam inativados. Dois quatis foram positivos para a amplificação por PCR que identifica o Complexo *M. tuberculosis*. À necropsia, foram observadas extensas lesões nos pulmões. A PCR direta da amostra tecidual foi negativa em razão da menor sensibilidade do teste para amostras não provenientes de cultivo. A cultura mostrou crescimento de colônias compatíveis com micobactérias, a partir da qual realizou-se PCR para diferenciar as espécies do Complexo *M. tuberculosis*. Os resultados foram compatíveis com a presença de *M. bovis* nas lesões pulmonares. **Conclusão:** Suspeita-se que outros animais do CETAS que apresentavam a doença na forma crônica transmitiram-na por contato próximo com os quatis. O diagnóstico preciso e o controle da tuberculose nesses animais foi importante devido ao risco de transmissão para outros animais e humanos, representando um grave problema de saúde pública.