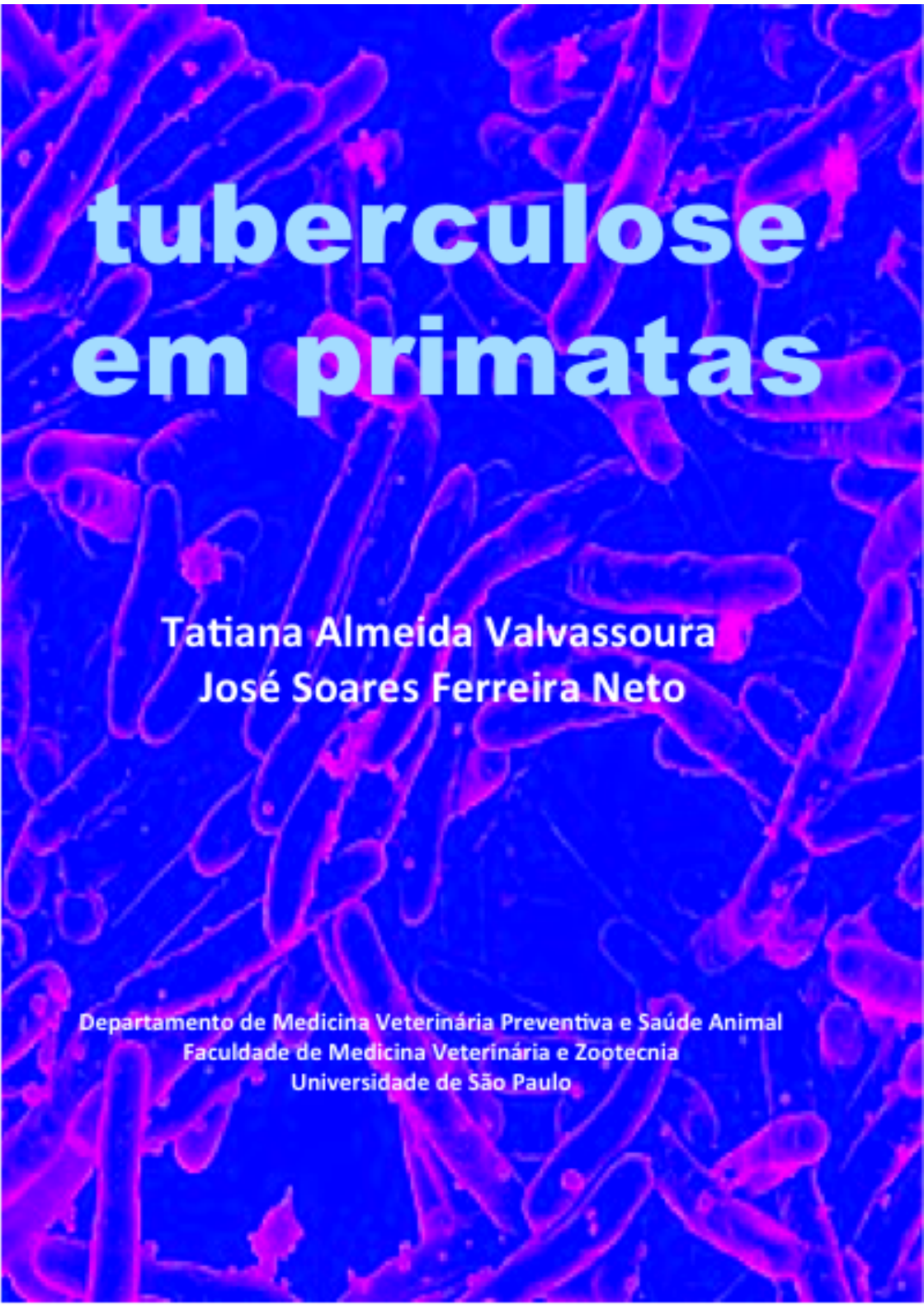


The background of the cover is a dense, abstract pattern of pink and purple elongated, rod-like shapes, resembling bacteria or microorganisms, set against a dark blue background.

tuberculose em primatas

Tatiana Almeida Valvassoura
José Soares Ferreira Neto

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Tuberculose em primatas

Tuberculose em primatas

Tatiana Almeida Valvassoura

Mestre em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses,
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, Brasil

José Soares Ferreira Neto

Professor Titular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e
Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, Brasil

São Paulo
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo
2014

Qualquer parte desta publicação pode ser reproduzida, desde
que citada a fonte

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

Biblioteca Virginie Buff D'Ápice
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Valvassoura, Tatiana Almeida.

Tuberculose em primatas / José Soares Ferreira Neto – São
Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, 2014.
193 p.

ISBN: 978-85-67421-03-2

1. Tuberculose. 2. Primatas. 3. Animais silvestres. 4.
Prevenção. I. Ferreira Neto, José Soares.

Dedicatória

Para meu gato Ju, inspiração para me tornar veterinária

Tatiana Almeida Valvassoura

Para Agair

José Soares Ferreira Neto

Prefácio

A Tuberculose é um dos maiores problemas sanitários dos animais selvagens mantidos em cativeiro para os mais variados propósitos. Grande parte das ocorrências envolve a transmissão zoonótica e os primatas não humanos são os animais mais frequentemente afetados. Em função das complexidades para o seu controle, determina grandes perdas econômicas e a estigmatização da instituição que a reporta. Enquanto nos países da América do Norte e Europa é tratada como prioridade, havendo estratégias definidas por legislação, no Brasil, existe quase completa omissão em relação à doença, o que resulta em individualismo no trato do problema por parte das instituições mantenedoras de animais cativos. Assim, este livro trata desse assunto sob a ótica da medicina veterinária preventiva, com natural ênfase nas populações animais. Aborda desde aspectos históricos até sistemas de vigilância, passando por detalhes da etiologia, epidemiologia, patogenia, sinais clínicos, diagnóstico e legislação brasileira, visando chamar atenção para o tema e inspirar iniciativas para o bom encaminhamento da questão no nosso meio.

Preface

Tuberculosis is one of the greatest health problems for wild animals kept in captivity. Non-human primates are the most commonly affected animals and much of the occurrences involves zoonotic transmission. The disease implies in great economic losses and stigmatization of the institution due to the complexities of its control. While in the countries of North America and Europe tuberculosis is treated as a priority, with countrywide strategies defined by law, in Brazil there is an almost complete omission regarding the disease, which leads to the emergence of local and unconnected strategies developed by the institutions keeping animals in captivity. Thus, this book tackles this issue from the perspective of preventive veterinary medicine, with emphasis on animal populations. Discusses since the historic aspects until the surveillance systems, with details of the etiology, epidemiology, pathogenesis, clinical signs, diagnosis and Brazilian legislation, aiming to draw attention to the problem and inspire initiatives to address it in our country.

Lista de Figuras

Figura 1	A casa da girafa no Jardim Zoológico de Berlin, 1890. Fonte: KEMPTER , 1890 apud HOCHADEL, 2005	18
Figura 2	Macacos em cativeiro igualmente fascinados como aqueles que vieram observá-los. Fonte: DORÉ , 1872 apud HOCHADEL, 2005	19
Figura 3	Jardim da Aclimação aberto em 15 de fevereiro de 1861. Fonte: SAINT-HILAIRE , 1861 apud HOCHADEL, 2005	20
Figura 4	Diagrama da Parede Celular das micobactérias. Fonte: TAMBE, 2006	35
Figura 5	Linfonodo mediastínico de macaco rhesus com exsudato caseoso evidenciado ao corte, decorrente de infecção por tuberculose. Fonte: SHIPLEY et al., 2008	52
Figura 6	Célula gigante multinucleada (seta) em granuloma não encapsulado de linfonodo de macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>). Fonte: SHIPLEY et al., 2008	53
Figura 7	Pulmão de macaco rhesus com célula gigante multinucleada. Fonte: LEWINSOHN et al., 2006	54
Figura 8	Fêmur de macaco com osteomielite crônica causada por tuberculose. Fonte: IALEGGIO, 1997	62
Figura 9	Abscesso cutâneo na região femoral de macaco Aotus decorrente de infecção por tuberculose. Fonte: IALEGGIO, 1997	63
Figura 10	Inoculação intradérmica de tuberculina em pálpebra de macaco. Fonte: UNIVERSITY OF CINCINNATI, 2011	73
Figura 11	Macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) com reação positiva ao teste tuberculínico na pálpebra superior esquerda, apresentando inchaço e eritema. Fonte: SHIPLEY et al., 2008	76
Figura 12	Teste Prima TB STAT-PAK®. A figura da esquerda representa resultado negativo e a da direita positivo; na janela do teste, a linha mais acima, presente em ambos os lados, é a banda controle; a linha mais abaixo (seta) é a banda que indica resultado positivo. Fonte: LYASHCHENKO et al., 2007	93
Figura 13	Célula gigante multinucleada com bacilo álcool-ácido resistentes (seta); coloração Ziehl-Neelsen em tecido pulmonar de macaco rhesus infectado por M. tuberculosis. Fonte: LEWINSOHN et al., 2006	97
Figura 14	Pulmão de macaco rhesus com granulomas (setas). Fonte: GORMUS et al, 2004	108
Figura 15	Equipamentos de proteção individual utilizado no manejo com primatas não humanos.	151
Figura 16	Placas de avisos para funcionários e visitantes	152

Sumário

Introdução e História	11
Etiologia	28
Epidemiologia	37
Patogenia	47
Sinais Clínicos	59
Métodos de Diagnóstico	64
6.1 Métodos de Diagnóstico Indireto	67
6.1.1 Teste de tuberculinização intradérmico	67
6.1.2 PRIMAGAM® (IFN- γ)	81
6.1.3 ELISPOT (<i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>)	85
6.1.4 ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) e outros testes sorológicos	86
6.2 Métodos de Diagnóstico Direto	94
6.2.1 Métodos de coloração em lâminas e cultivo bacteriano	94
6.2.2 Técnicas moleculares	99
6.3 Imagens	105
6.4 Necropsia e Achados Microscópicos	107
Tratamento	113
Prevenção	117
8.1 Introdução de Novos Animais	119
8.2 Quarentena	127
8.3 Rotina de Testes Pós-Quarentena - Vigilância	139
8.4 Estrutura, Limpeza e Desinfecção de Recintos	141
8.5 Monitoramento da Saúde dos Funcionários	148
Reflexões Finais	153
Conclusões	165
Referências Bibliográficas	168

1 INTRODUÇÃO E HISTÓRIA

O desejo de se ter uma coleção de animais e plantas é antigo. Várias civilizações possuíam esse costume desde os tempos mais remotos, como podemos observar revendo a história. Essas coleções de animais eram mantidas por vários motivos, como símbolos de poder e riqueza, por interesse zoológico, para entretenimento e diversão dos mais ricos (STANLEY, 2002).

No Egito antigo, a nobreza já possuía o hábito de manter animais selvagens como uma maneira de ostentar força e poder. Capturavam leões, gatos selvagens e babuínos durante as viagens e batalhas e os mantinham em seus templos. Os cidadãos comuns adotaram esse costume e passaram também a colecionar animais exóticos. Quanto mais exótico e raro fosse o animal, maior *status* social adquiria o seu proprietário (BOSTOCK, 1998).

Na China, os macacos eram considerados sagrados e mantidos em templos onde eram

tratados com muitas mordomias. Na antiga Mesopotâmia (atual Iraque e terras próximas), Grécia e Roma existiam coleções de grandes felinos. Os romanos chegaram a ter um rinoceronte, sendo que outro animal desta mesma espécie só voltou a ser visto na Europa em 1770, quando Luís XVI ganhou um como presente (STANLEY, 2002).

Nas culturas pré-hispânicas do México, encontram-se numerosas evidências sobre a capacidade de observação e admiração que estes povos tinham com a natureza. Várias espécies de animais estavam associadas aos deuses, como a serpente, a águia e o jaguar, que eram símbolos de bravura e poder. Os exploradores espanhóis fizeram descrições sobre a fauna e a flora que encontraram ao chegarem à nova terra. Em uma dessas descrições foram encontradas as primeiras referências sobre animais silvestres, entre elas se destaca a de Hernán Cortés, que em sua segunda

carta enviada ao imperador Carlos V (1520) descreveu a existência da casa das aves e das feras e a grandiosidade do Palácio de Axayácatl (Palácio de Moctezuma) pertencentes ao antigo império asteca (STANLEY, 2002). Registros indicam que a primeira casa das aves possuía grandes proporções, com dez tanques de água doce e salgada, onde se reproduziam diversas espécies de aves aquáticas, com mais de 300 homens trabalhando no local. Na casa das feras havia recintos para lobos, raposas e diferentes felinos, assim como crocodilos e serpentes, que também se reproduziam no local (STANLEY, 2002).

Na Europa, durante a Idade Média, mantinham-se coleções de animais para satisfazer os desejos da monarquia. A partir do final do século XVI e início do século XVII, aparecem as primeiras estruturas semelhantes ao que conhecemos hoje como zoológicos para visitação

pública, destacando na Europa o zoológico de Dresden, fundado em 1554, e o de Belvedere, em Viena (1716), este passou a fazer parte do Zoológico Imperial de Viena depois de 36 anos (OREJAS¹, 1973 apud STANLEY, 2002) e é considerado o zoológico mais antigo existente até hoje (HEDIGER, 1964).

Na Inglaterra, a coleção real de animais da casa das feras era mantida na Torre de Londres. Essa coleção era utilizada por Willian Harvey para estudar a circulação sanguínea. Em 1828, a coleção de animais passou para a custódia da Sociedade Real de Zoologia, e em 1829, tornou-se o zoológico de Londres, dentro do Parque dos Regentes. Foi aberto à visitação pública somente em 1847 (HEDIGER, 1964).

¹ OREJAS, M. B. Parques zoológicos: su función educativa y su aporte a la preservación de las especies. **Ciencia Interamericana**, v.14, n.1-2, p. 12-21, 1973.

O surgimento do Parque Zoológico dos Regentes inspirou a fundação de grande número de outros zoológicos durante o século XIX. Doze zoológicos foram criados na Alemanha entre 1844 e 1869. Outros foram fundados em todo o mundo, como em Melbourne, em 1857, New York, em 1873, Calcutá, em 1875, e Cairo, em 1891. Os novos locais de exibição de animais selvagens eram muito maiores que os antigos e passaram a ser chamados de parques ou jardins zoológicos (HOCHADEL, 2005). Esses zoológicos eram utilizados para a introdução de novas espécies, vindas principalmente das colônias para a Europa, onde eram capturadas diretamente da natureza. Houve uma tentativa de domesticação e algumas vezes reprodução desses animais, o que era chamado, na época, de aclimatização. O sucesso da aclimatização com animais foi limitado, pois sua manipulação não era fácil e seus hábitos alimentares e reprodutivos não eram bem

conhecidos. Consequentemente, muitos animais morreram. Os recintos eram pequenos, construídos basicamente para favorecer a boa visualização dos animais pelo público e não havia a preocupação em garantir adequadas condições de vida em cativeiro (Figuras 1 e 2). Com as plantas o processo de aclimatização era feito desde o século XVII e redundou em maior sucesso (Figura 3) (OSBORNE², 1994 apud HOCHADEL, 2005).

²OSBORNE, M. Nature, the exotic, and the science of French colonialism. Bloomington, USA: Indiana University Press, 1994. RITVO, H. The Animal Estate. In: _____. **The English and other creatures in the Victorian Age**. Cambridge, MA, USA: Harvard University Press, 1987. p. 232-242.



Figura 1 - A casa da girafa no Jardim Zoológico de Berlim, 1890

Fonte: KEMPTER³, 1890 apud HOCHADEL, 2005

³ KEMPTER, H. **The giraffe house in the Berlin Zoological Garden**. Reproduced, with permission, from the collection of the Stadtmuseum, Berlin, 1890.

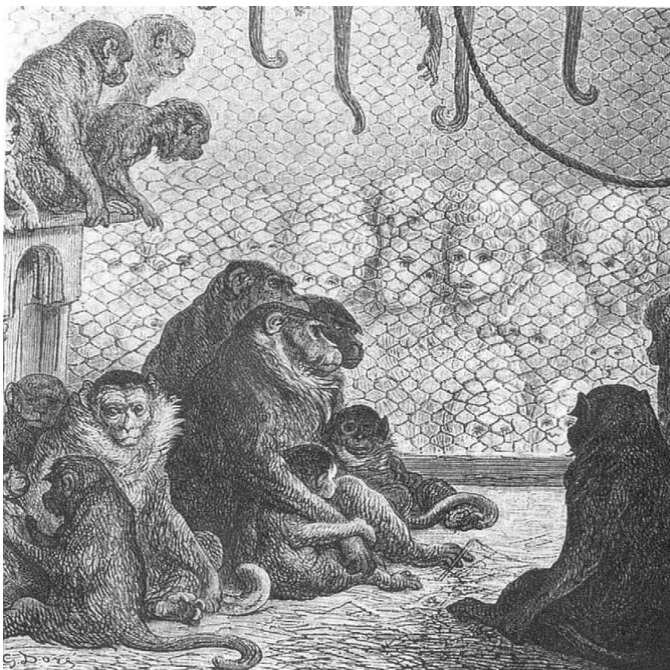


Figura 2 - Macacos em cativeiro igualmente fascinados como aqueles que vieram observá-los

Fonte: DORÉ⁴, 1872 apud HOCHADEL, 2005

⁴DORÉ, G. **In the monkey house**. Reproduced from Doré, G. and Jerrold, B., 1872. London: A Pilgrimage, Grant & Co. (London, UK).

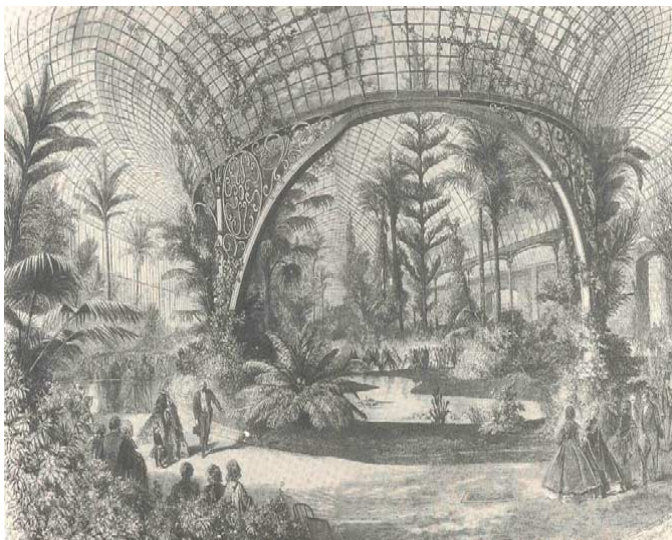


Figura 3 - Jardim da Aclimação aberto em 15 de fevereiro de 1861

Fonte: SAINT-HILAIRE⁵, 1861 apud HOCHADEL, 2005

No início do século XX, Carl Hagenbeck fundou, na Alemanha, em Hamburg-Stellingen, o *Tierpark Hagenbeck*, que foi considerado um novo modelo de zoológico, onde os animais eram mantidos em recintos maiores e mais adequados,

⁵ SAINT-HILAIRE, I. G. Jardin d'Acclimatation. Image reproduced from **L'Illustration**, 1861.

com a reprodução de algumas condições de seu habitat natural. Diante desse projeto revolucionário, outros países da Europa e os Estados Unidos passaram a seguir o modelo adotado pelo zoológico alemão, disponibilizando uma estrutura mais adequada para a manutenção de animais silvestres em cativeiro (BOSTOCK, 1998). Contudo, o único propósito de todos esses zoológicos era o de mostrar os animais, especialmente os exóticos, e sempre priorizar os interesses econômicos (BOSTOCK, 1998; MIRANDA⁶, 1973 apud STANLEY, 2002).

Em meados do século XX, já existiam zoológicos no continente americano, como os de New York e Washington, nos Estados Unidos, o do Rio de Janeiro, no Brasil, e o de Havana, em Cuba (MIRANDA⁶, 1973 apud STANLEY, 2002).

⁶ MIRANDA, O. Parques Zoológicos: su función educativa y su aporte a la preservación de espécies. **Ciencia Interamericana**, v.14, n.1-2, p. 12-21, 1973.

Na década de 1960, houve uma mudança na concepção do que seria um zoológico. Este passou a ser um centro de exibição e confinamento de animais, levando-se em consideração suas necessidades vitais, garantindo melhores condições de vida em confinamento. Além disso, tornou-se também um local de recreação, educação, pesquisa, conservação e reprodução da fauna e flora (STANLEY, 2002).

O confinamento dos animais selvagens de diferentes regiões geográficas, em geral em uma área relativamente pequena e com a interferência permanente do homem, criou condições que facilitaram a disseminação de patógenos neste ambiente, o que propiciou o aparecimento de doenças até então desconhecidas nas espécies confinadas (CUBAS, 2008), como a tuberculose. A tuberculose vem acometendo animais selvagens desde o surgimento das primeiras coleções organizadas para sua exibição. Estudos

demonstraram alta prevalência da doença a partir da metade do século dezenove até a metade do século vinte em zoológicos dos Estados Unidos e da Europa (HINES et al., 1995). O registro mais antigo de tuberculose em Zoológico foi feito por Owen em 1836, em um chimpanzé, na cidade de Londres (OWEN⁷, 1836 apud MONTALI et al., 2001, p. 291).

Nos animais silvestres mantidos em cativeiro, as infecções pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* são as mais prevalentes e importantes, com destaque para o *M. tuberculosis* (MANNING; COLLINS, 2001; ROCHA et al., 2011a, b, 2013a). Essas micobactérias são altamente

⁷ OWEN R. On the morbid appearance observed in the dissection of a chimpanzee (*Simia troglodytes*). 1836 apud RITCHIE, J. N.; MACRAE, W. D. Tuberculosis in animals. In: Symposia of the Zoological Society of London, 1961. London. **Anais...** London: Zoological Society of London, 1961. p. 69-79.

virulentas e patogênicas para várias espécies de animais, notadamente para primatas, que podem se tornar fonte de infecção para outros animais e também para humanos (UNE; MORI, 2007). Em zoológicos, observou-se alta incidência de infecção em primatas causada principalmente pelo *M. tuberculosis*, com perdas acima de 40% em algumas coleções (RUCH⁸, 1959 apud MONTALI et al., 2001). Em animais de vida livre, localizados em áreas distantes da ocupação humana e sem contato direto com o homem, é muito rara a observação da doença; porém, curiosamente, nas últimas décadas, a tuberculose em animais de vida livre tem alcançado níveis preocupantes em alguns países, principalmente em babuínos e leões nos parques africanos (CLIFTON-HADLEY et al., 2001; LISLE et al., 2002; CORNER, 2006;

⁸RUCH, T. C. **Disease of laboratory primates.** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1959. p. 199.

MICHEL et al., 2006; O'BRIEN et al., 2011). Tratando-se da tuberculose dos primatas não humanos mantidos em cativeiro, a literatura especializada indica sempre como fonte de infecção os humanos, sejam eles tratadores ou visitantes. Assim, a situação epidemiológica da tuberculose humana onde se localizam os zoológicos está associada à ocorrência da doença nas coleções animais.

Em 2010, a Organização Mundial da Saúde (WHO) estimou que 1,1 milhões de pessoas morreram de tuberculose, excluindo-se os portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). A incidência global da infecção estimada em 2010 foi de 8,8 milhões de pessoas em uma população de 6,87 bilhões (128 casos/100.000 pessoas), sendo que a maioria dos casos ocorreu na Ásia (59%) e na África (26%). No Brasil, a incidência estimada em 2010 foi de 74.395 novos casos e reincidentes, em uma população de 195

milhões de pessoas. A taxa de mortes por tuberculose vem caindo desde 1990, e a incidência da doença, em uma estimativa global também está diminuindo, mas o declínio é lento (WHO, 2011). Observa-se, também, um aumento de casos de infecção por *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium* em humanos infectados pelo HIV e em pessoas imunodeficientes. Em decorrência desses fatos, autoridades em saúde pública têm se preocupado com o desenvolvimento de resistência das micobactérias aos antibióticos (TIRUVILUAMALA; REICHMAN, 2002), problema que se agravou com o tempo. Os casos de pacientes com bactérias resistentes a várias drogas foi estimado em 250.000 em 2009 (WHO, 2010), e em 290.000 em 2010 (WHO, 2011).

Apesar dos avanços em relação ao controle da tuberculose humana e da tuberculose em animais de produção, esta doença ainda é um dos principais problemas sanitários em coleções de

animais silvestres mantidas em cativeiro, principalmente de primatas não humanos. Assim, esta publicação traz uma revisão sobre o tema, desde a história dos zoológicos e o registro dos primeiros casos até os métodos atualmente utilizados para a sua prevenção e controle.

2 ETIOLOGIA

Tendo em vista sua natureza insidiosa, adicionada ao fato de alcançar altas prevalências, espalhar-se rapidamente, causar altas taxas de mortalidade e ser zoonose, a tuberculose é uma das mais importantes doenças bacterianas de primatas não humanos mantidos em cativeiro. É causada principalmente por duas espécies de bacilos intracelulares aeróbios facultativos pertencentes ao Complexo *Micobacterium tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*, (WALSH et al., 1996; BENNETT et al., 1998; CAPUANO et al., 2003; FLYNN et al., 2003; VERVENNE et al., 2004).

Atualmente, o Complexo *Micobacterium tuberculosis* é composto por oito espécies de bacilos: *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose humana; *M. africanum*, principal agente de tuberculose humana no continente africano, detectada em 60% dos casos (subtipo I, similar ao *M. bovis*, mais frequente na região oeste

do continente africano, e subtipo II, similar ao *M. tuberculosis*, mais frequente na região leste do continente africano); *M. bovis*, que infecta principalmente o bovino e também um grande número de espécies de mamíferos selvagens e domésticos, incluindo o homem; *M. bovis-Calmette-Guérin (BCG)*, uma variante avirulenta obtida em laboratório a partir de uma cepa de *M. bovis*, que é usada como vacina, como veículo recombinante para outras vacinas e como tratamento imunogênico; *M. canettii*, considerado uma rara variante da *M. tuberculosis*, que causa doença no homem; *M. microti*, causadora da doença em pequenos roedores; *M. caprae*, que infecta principalmente caprinos, podendo acometer o homem; e *M. pinnipedii*, espécie causadora da tuberculose em pinípedes, já detectada em vários continentes (BROSMAN, 1992; ARANAZ et al., 1999; BROSCH et al.,

2001; COUSINS et al., 2003; PALMER, 2007; AMORIM, 2014).

A maioria das micobactérias é saprófita, tendo como habitat o solo e a água, e raramente está envolvida em processos patogênicos. Entretanto, existem aquelas que mesmo sobrevivendo no ambiente possuem como principal nicho ecológico tecidos de animais de sangue quente, como as espécies do Complexo *Micobacterium tuberculosis* (THOEN; CHIODINI, 1993).

Essas bactérias possuem características genéticas semelhantes, tendo 99,9% de similaridade nucleotídica e sequências idênticas do 16S do RNA ribossômico, além das semelhanças dos padrões morfológicos e bioquímicos, como a forma da colônia e o crescimento em meio seletivo (BROSCH et al., 2002; FU; FU-LIU, 2002). São bastonetes aeróbios, intracelulares facultativos, imóveis, não

capsulados, não esporulados e álcool-ácido resistentes, medindo de 0,2 a 0,6 x 1 a 10 µm (MURRAY et al.⁹, 1998 apud KANEENE; THOEN, 2004; MURRAY et al., 2009).

A parede celular desses bacilos é muito complexa e rica em lipídeos (Figura 4). Várias características, assim como a relação com o hospedeiro, estão diretamente ligadas à sua composição e estrutura. Características, como crescimento lento, exigência de nutrientes específicos em meios de cultura, resistência às condições ambientais, resistência a drogas antimicrobianas, antissépticos e desinfetantes, resistência à descoloração pelo álcool-ácido e tendência à aglutinação são determinadas em decorrência do alto teor de lipídeos da parede

⁹ MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. PFALLER, M. A. *Mycobacterium*. In: _____. **Medical microbiology**. 3rd ed. St Louis: Mosby Year Book Inc., 1998. p. 319-330.

celular (MURRAY et al., 2009). Ela é formada pelos segmentos inferior e superior. Como mostra a Figura 4, o segmento superior é composto por lipídeos livres (1). Proteínas e glicolipídeos encontram-se intercalados entre esses lipídeos livres. Os glicolipídeos, como a molécula de lipoarabinomana e suas variantes (6), são responsáveis pela resposta inflamatória granulomatosa (BRENNAN, 2003). No segmento inferior, em contato com a membrana plasmática (5), encontram-se o fosfatidilinositol manosídeo (7) e os peptideoglicanos (4) em ligação covalente com a arabinogalactana (3), que por sua vez está ligada aos ácidos micólicos (2), que conferem a característica tintorial denominada álcool-ácido resistência. Essa estrutura compacta e organizada é o principal componente da parede celular, formando seu esqueleto, que é responsável pela sua baixa permeabilidade (DAFFÉ; DRAPER, 1998; BRENNAN, 2003). Quando as

micobactérias são inseridas em um meio que favorece a ruptura da parede celular, como a adição de solventes, os lipídeos livres (1) e as proteínas (6) são dissolvidos, mas o complexo formado pelo ácido micólico (2), a arabinogalactana (3) e o peptideoglicano (4) permanece como um núcleo insolúvel (BRENNAN, 2003).

A estrutura da parede celular também está relacionada à virulência dessas bactérias. O fator corda, composto por sulfolipídeos, micosídeos e lipoarabinomanas (localizadas no segmento superior da parede celular), funciona como mediador da virulência, agindo nos mecanismos de persistência intracelular e de inibição da ativação de macrófagos (TOOSSI; ELLNER, 2000).

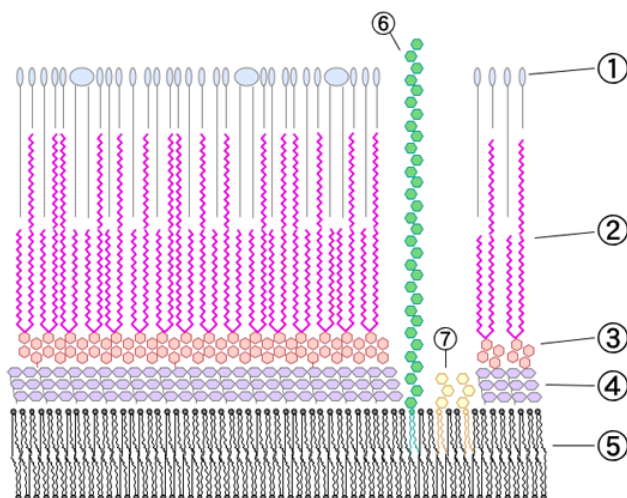


Figura 4 - Diagrama da Parede Celular das micobactérias

Fonte: TAMBE, 2006

A resistência às condições ambientais também está diretamente relacionada às características da parede celular das micobactérias, permitindo que a sua sobrevivência, fora do organismo animal, seja relativamente longa quando comparada à de outros patógenos. Ambientes com alta umidade e baixa incidência de luz solar são bastante

propícios para sua sobrevivência, sendo sensíveis ao calor e à radiação ultravioleta. Nas fezes e no solo podem sobreviver por até dois anos, na água por até doze meses e em carcaças por dez meses, se as condições ambientais forem favoráveis (WHO, 1984).

Em programas de sanidade animal, é essencial conhecer essas características da célula micobacteriana, pois a resistência às condições ambientais e aos desinfetantes interfere diretamente na eficiência das medidas de controle.

3 EPIDEMIOLOGIA

A suscetibilidade ao bacilo da tuberculose varia de acordo com a espécie animal. Dentro do grupo de animais com maior suscetibilidade encontram-se os primatas. Embora alguns países tenham verificado uma significativa redução da incidência da doença em animais mantidos em cativeiro desde a década de 1970, devido à introdução de barreiras físicas nos recintos e à aplicação dos protocolos de quarentena, a tuberculose ainda é um dos principais problemas sanitários nestes ambientes. Surtos da doença continuam a ocorrer em colônias de macacos com alta mortalidade e morbidade, tendo como consequência grandes perdas econômicas, com a morte de animais e o custo para o controle da doença (LERCHE et al., 2008).

O registro mais antigo de tuberculose em Zoológico foi feito em 1936, em Londres,

relatando um caso em um chimpanzé (OWEN¹⁰, 1836 apud MONTALI et al., 2001).

No zoológico de Londres, de janeiro de 1925 a julho de 1927, 51 casos de tuberculose em macacos foram detectados, sendo que 44 animais eram de espécies do “Velho Mundo” e 7 eram do “Novo Mundo” (SCOTT ¹¹ , 1930 apud O'REILLY; DABORN, 1995).

Wilson et al. (1984) relataram um surto de tuberculose causado por *M. bovis* no zoológico de Dublin, acometendo várias espécies de primatas (*Lemur mayottensis mayottensis*, *Erythrocebus*

¹⁰ OWEN, R. On the morbid appearance observed in the dissection of a chimpanzee (*Simia troglodytes*). 1836 apud RITCHIE, J. N.; MACRAE, W. D. Tuberculosis in animals. In: Symposia of the Zoological Society of London, 1961, London. **Anais...** London: Zoological Society of London, 1961. p. 69-79.

¹¹ SCOTT, H.H. Tuberculosis in man and lower animals. **Med. Research Council. Spec. Ser.**, London: HMSO, 1930. n. 149, p. 270. (Special Report Series. Medical Research Council, 149).

patas, *Macaca silenus*, *Symphalangus syndactylus*) que se encontravam na área de isolamento da instituição. O *M. bovis* foi isolado de várias espécies que acabaram morrendo depois de apresentar um quadro de infecção pulmonar.

No Japão, entre 1960 e 1995, ocorreram infecções por *M. tuberculosis* em macacos-rabo-de-porco (*Macaca nemestrina*), orangotangos e chimpanzés. Mais recentemente, em cativeiro na área de Kansai, dois macacos japoneses (*Macaca fuscata*) morreram em julho e outubro de 2004, e o diagnóstico final foi infecção por *M. tuberculosis*. Os outros animais, que viviam no mesmo local, resultaram positivos ao teste tuberculínico e foram eutanasiados. Em 2004, outro surto em zoológico atingiu quatro macacos da espécie *Colobus guereza* e oito macacos da espécie *Cebus apela*, que morreram ou foram eutanasiados em função de resultado positivo à tuberculinização. Ambas as espécies estavam

infectadas por *M. tuberculosis*. Em seguida quatro funcionários, sendo dois veterinários que fizeram a necropsia desses animais, testaram positivo para tuberculose e um dos veterinários desenvolveu a doença. (UNE; MORI, 2007).

Michel e Huchzermeyer (1998) relataram, na África do Sul, um caso de infecção por *M. tuberculosis* em sagui de tufo branco (*Cattithrix jacchus*). O primata era um animal de companhia e foi infectado por um dos proprietários, que havia sido tratado de tuberculose pulmonar oito anos antes de a doença ser diagnosticada no animal.

No Brasil, Rocha et al. (2011a) relataram o caso de um macaco aranha fêmea (*Ateles paniscus*), mantido no Parque Estoril, em São Paulo, que apresentou apatia em julho de 2007. Ao exame clínico observou-se emaciação e endurecimento dos linfonodos submandibular, axilar e inguinal, e presença de uma massa de 5 cm na cavidade abdominal. O animal foi tratado

com antibióticos (enrofloxacina, azitromicina e ceftiofur), porém morreu seis meses depois. A necropsia revelou vários nódulos caseosos em pulmão, baço, fígado, rins e pleural parietal e visceral. Bacilos álcool-ácido resistentes foram isolados e identificados como *Mycobacterium tuberculosis*.

A tuberculose não existe em primatas selvagens na natureza, que vivem longe de habitações humanas. O contato com o homem infectado é a principal causa de exposição ao *M. tuberculosis* para esses animais (KAUFMANN; ANDERSON¹², 1978 apud MONTALI et al., 2001). Infecções por *M. tuberculosis* têm sido detectadas em babuínos selvagens de vida livre, na

¹² KAUFMANN, A. F.; ANDERSON, D. C. Tuberculosis control in non-human primates colonies. In: MONTALI, R. J. (Ed.). **Mycobacterial infections of zoo animals**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1978. p. 227-234.

área periurbana de Cape Town, África do Sul. Provavelmente, é resultado do hábito de mexer no lixo humano. Esse comportamento também tem sido associado a surtos de tuberculose por *M. bovis* em babuínos de vida livre (KEET et al., 2000; PARSONS et al., 2009).

Apesar de todas as espécies de primatas serem suscetíveis tanto à infecção pelo *M. tuberculosis* como pelo *M. bovis*, observa-se uma hierarquia na suscetibilidade entre as espécies. Primatas do “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África) são importantes do ponto de vista da saúde pública, pois são mais suscetíveis para *M. bovis* e *M. tuberculosis* do que os grandes primatas não humanos (gorila, orangotango e chimpanzé), que por sua vez parecem ser mais suscetíveis que os primatas do “Novo Mundo” (MONTALI et al., 2001). Entretanto, observa-se que a tuberculose tem sido documentada em numerosas espécies, tanto do Novo quanto do Velho Mundo (THOREL

et al., 1998; ISAZA, 2003). Segundo Kaufmann e Anderson¹² (1978) apud MONTALI et al. (2001), a incidência em espécies do “Velho Mundo” é alta, com alta prevalência no macaco rhesus (*Macaca mulatta*), no qual a doença se espalha rapidamente, com a morte do animal em menos de um ano. As espécies *Callitrix*, *Cebus*, *Ateles* e *Saimiri* parecem ser mais suscetíveis entre as espécies do “Novo Mundo”, enquanto o gênero *Aotus* parece ter certo grau de resistência para a doença (BONE; SOAVE, 1970; MORELAND, 1970; LEATHER; HAMM, 1976; FORTMAN et al.¹³, 2001 apud ALFONSO et al., 2004).

A principal forma de transmissão ocorre através da via aérea, com a inalação de aerossóis contendo partículas infectantes, eliminadas quando o animal ou o homem infectado tosse ou

¹³FORTMAN, J. D.; HEWETT, T. A.; BENNETT, B. T. **The laboratory nonhuman primate**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001.

espirra (FRANCIS, 1971; SAPOLSKY; ELSE, 1987; DALOVISIO et al., 1992; McMURRAY; BARTOW, 1992). A transmissão via trato respiratório é a forma mais eficiente entre os animais confinados, pois requer uma quantidade pequena de organismos para compor uma dose infectante. A transmissão do *M. bovis* ocorre também através da ingestão de água e alimentos contaminados com secreções, fezes ou urina, que contenham micobactérias, e pela ingestão de leite contaminado pelos filhotes (FRANCIS, 1971; SAPOLSKY; ELSE, 1987; DALOVISIO et al., 1992).

Outras formas de transmissão geralmente ocorrem através de brigas (mordidas), contato com fômites contaminados e através de procedimentos médicos com materiais contaminados (KING, 1993; KAUFMANN; ANDERSON¹⁴, 1978 apud

¹⁴ KAUFMANN, A. F.; ANDERSON, D. C. Tuberculosis control in non-human primates colonies. In: MONTALI, R. J. (Ed.). **Mycobacterial infections of zoo animals**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1978. p. 227-234.

MONTALI et al., 2001). Recintos com grande densidade de animais e alimentação deficiente aumentam a probabilidade de a doença espalhar-se e progredir rapidamente (McMURRAY; BARTOW, 1992).

As micobactérias podem ser eliminadas pelo hospedeiro através das secreções do trato respiratório, fezes, urina e por meio de fístulas submandibulares (FRANCIS, 1971; GOOD, 1984; SAPOLSKY; ELSE, 1987). As secreções, na maioria das vezes, são engolidas ao invés de serem expectoradas, o que aumenta a possibilidade de haver uma grande quantidade de bacilos nas fezes, podendo formar aerossóis durante a limpeza dos recintos (GOOD, 1984).

O conhecimento das vias de eliminação e dos mecanismos de transmissão das micobactérias é essencial para a estruturação de programas de prevenção e controle da doença em instituições mantenedoras de primatas em cativeiro.

4 PATOGENIA

A doença pode apresentar-se na forma latente, sem sinais clínicos (GORMUS et al., 2004), ou então desenvolver-se de maneira crônica, progressiva ou aguda (RENQUIST; WHITNEY, 1978; MONTALI et al., 2001; FROST, 2006). O período de incubação e forma de evolução depende da virulência e patogenicidade da cepa envolvida, da dose infectante, da porta de entrada e das condições imunológicas do animal (THOEN; BARLETTA¹⁵, 2004 apud KANEENE; THOEN, 2004).

As portas de entrada mais frequentes são os tratos respiratório e digestivo. Assim, os bacilos da tuberculose podem alcançar o pulmão ou o intestino, onde são fagocitados por macrófagos residentes. A característica lipídica da

¹⁵THOEN, C. O.; BARLETTA, R. G. *Mycobacterium*. In: PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 3rd ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2004. cap. 6.

parede celular das micobactérias, em especial o “fator corda”, confere relativa resistência às enzimas lisossomais e aos processos oxidativos que ocorrem dentro dos fagossomos, permitindo que sobrevivam e se multipliquem no interior de alguns macrófagos, causando a morte destas células e, conseqüentemente, sua liberação. Outros macrófagos, que são capazes de eliminar micobactérias, processam seus antígenos e os apresentam para os linfócitos T citotóxicos, que através da secreção de várias citocinas recrutam mais macrófagos para o local. Monócitos circulantes nos vasos sanguíneos periféricos também são recrutados para o local da infecção, onde se tornam ativos pela ação das citocinas liberadas pelos linfócitos reativos e pelos macrófagos, e então auxiliam a fagocitar os bacilos liberados pelos macrófagos mortos (KING, 1993; MONTALI et al., 2001; KANEENE; THOEN, 2004; FROST, 2006).

Os macrófagos e monócitos podem sofrer a ação das citocinas, como interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4), transformando-se em células epitelioides com membranas que se interdigitam com outros macrófagos e monócitos, numa tentativa de impedir a disseminação da infecção. Conforme essas células vão morrendo, outras surgem para substituí-las e circunscrever o processo formado por restos celulares e por micobactéria livres em sua porção central. Os linfócitos T citotóxicos desempenham um papel importante na ativação e recrutamento das células epitelioides e eventual destruição dos bacilos por elas cercados, formando as áreas centrais de necrose de caseificação que caracteriza um granuloma tuberculoso (Figura 5). Os granulomas eventualmente aumentam de tamanho, formando massas caseosas, que podem se mineralizar ou se liquefazer. A calcificação é rara em macacos, se comparada com o que é observado em humanos, e

há uma variação entre as espécies. Em alguns animais, pode-se observar a formação de granulomas sólidos não necróticos e também cavitação, com a micobactéria alcançando as serosas. Geralmente, com a morte dos tecidos, ocorre a liberação de mediadores da inflamação, que estimulam a proliferação de fibroblastos que podem encapsular a lesão. Em animais que apresentam a doença latente, observam-se poucos granulomas, sendo a maioria fibrosos. As células de Langhans (Figuras 6 e 7), que são células gigantes multinucleadas oriundas de macrófagos ativados, podem apresentar-se nos granulomas em pequena quantidade ou podem estar ausentes (KING, 1993; FLYNN et al., 2003; KANEENE; THOEN, 2004; FROST, 2006).

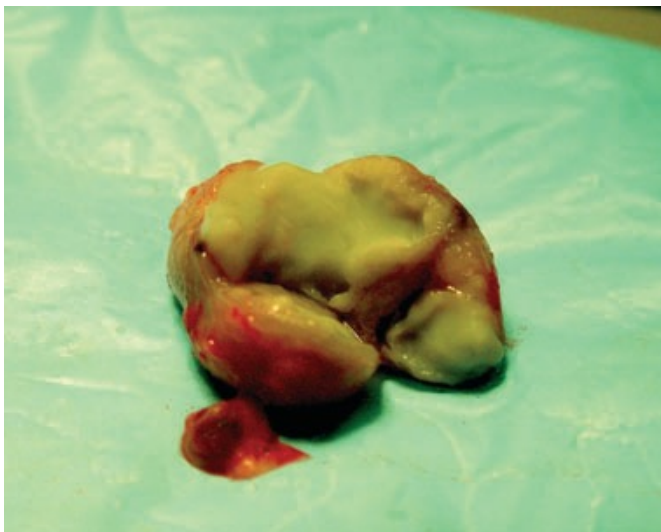


Figura 5 - Linfonodo mediastínico de macaco rhesus com exsudato caseoso evidenciado ao corte, decorrente de infecção por tuberculose

Fonte: SHIPLEY et al., 2008

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, que podem ser detectados por testes sorológicos a partir de um a dois meses após a infecção. Além disso, essas células estão presentes na estrutura do granuloma, mas sua participação na resposta imune contra a

tuberculose ainda não está completamente elucidada (FLYNN; CHAN, 2001).

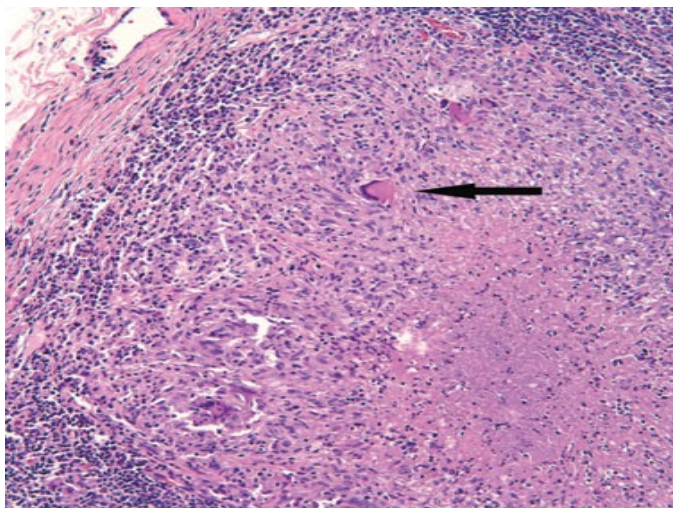


Figura 6 - Célula gigante multinucleada (seta) em granuloma não encapsulado de linfonodo de macaco rhesus (*Macaca mulatta*)

Fonte: SHIPLEY et al., 2008

Contemporaneamente, macrófagos podem transportar os bacilos da tuberculose para os linfonodos regionais e para outros tecidos onde o processo novamente se inicia. A associação da

infecção no sítio original, seja no pulmão ou no trato gastrointestinal, com a disseminação da infecção para os linfonodos regionais (mediastínicos ou mesentéricos) constitui o complexo primário (KING, 1993; CAPUANO et al., 2003; FLYNN et al., 2003; ISAZA, 2003; KANEENE; THOEN, 2004).

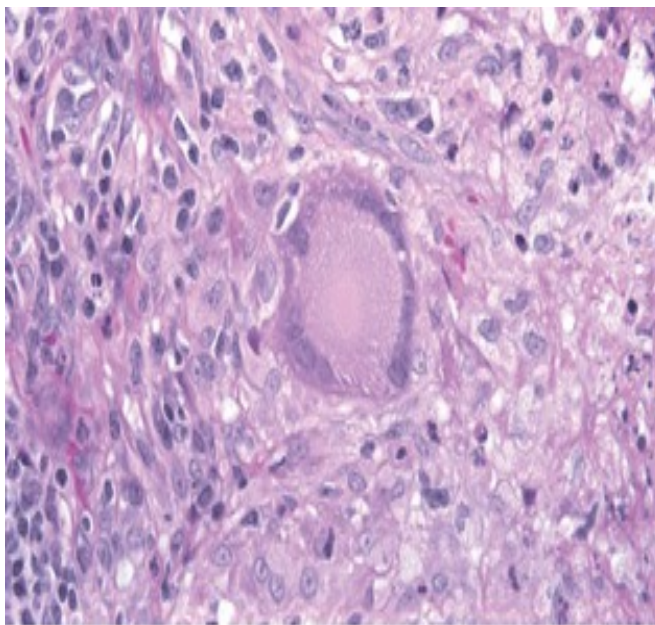


Figura 7 - Pulmão de macaco rhesus com célula gigante multinucleada

Fonte: LEWINSOHN et al., 2006

A evolução da doença a partir do foco primário, com generalização ou não da infecção, depende da interação entre a resposta imune do hospedeiro e a capacidade de proliferação dos bacilos nos macrófagos, podendo evoluir de várias formas: sem nenhuma evidência da doença, com doença de evolução rápida e progressiva, ou doença de evolução crônica e debilitante (CAPUANO et al., 2003). Como em humanos, nem toda infecção primária em primatas resulta em tuberculose ativa, podendo ocorrer o desenvolvimento de infecção latente, sem nenhum sinal de doença. Estudos iniciais levaram ao desenvolvimento de um modelo de infecção experimental pelo *M. tuberculosis* em primatas, no qual macacos adultos cynomolgus são inoculados com baixas doses de micobactérias (cerca de 25 unidades formadoras de colônia/por animal), diretamente nos pulmões. Como resultado, aproximadamente 40% dos animais desenvolveu

tuberculose ativa e 60% não apresentou nenhum sinal da doença (CAPUANO et al., 2003). Lin et al. (2008), valendo-se desse mesmo modelo de infecção com *M. tuberculosis*, após seis meses classificaram os animais em dois grupos: com doença ativa e com infecção latente, utilizando como critérios de avaliação exames clínicos, radiográficos do tórax e detecção de crescimento bacteriano no lavado gástrico e broncoalveolar. Naqueles com tuberculose ativa, foi observado o crescimento persistente de *M. tuberculosis* em culturas do lavado gástrico e/ou broncoalveolar e alterações radiográficas no tórax. Em contraste, aqueles com infecção latente apresentaram parâmetros clínicos normais, nenhum crescimento de *M. tuberculosis* nas cultura de lavado gástrico e/ou broncoalveolar e nenhuma alteração radiográfica do tórax.

Durante o período de latência, os animais saudáveis, imunocompetentes e sem nenhuma

deficiência nutricional, possivelmente se encontram em uma situação temporária de equilíbrio, onde a multiplicação das micobactérias ocorre em taxas muito reduzidas, mas estimulando a resposta celular do hospedeiro. Quando o animal perde a higidez imunológica, devido a infecções imunossupressoras concomitantes ou utilização de drogas imunossupressoras, ou situações estressantes causadas por desequilíbrios nutricionais ou ambientais, dá-se o aumento da multiplicação e disseminação das micobactérias, originando a tuberculose reativa, que muitas vezes leva à morte do hospedeiro. Os bacilos podem ganhar os vasos sanguíneos e linfáticos e alcançar outros órgãos, como fígado, baço, rins, adrenal, medula óssea, linfonodos e meninges. Essa forma generalizada da doença, conhecida como tuberculose miliar, é frequentemente fatal e ocorre principalmente em animais jovens (KING, 1993;

ISAZA, 2003; KANEENE; THOEN, 2004; FLYNN, 2006; LIN et al., 2008).

A detecção da forma latente da infecção ainda é um desafio para as instituições mantenedoras de primatas em cativeiro, pois estes animais podem resultar falsos positivos aos testes usuais de diagnóstico e serem introduzidos em coleções sadias, nas quais em determinado momento pode ocorrer a reativação da infecção, provocando o espalhamento da doença. Daí a importância de ações de quarentena e dos programas de vigilância, que utilizam estratégica e regularmente testes de diagnóstico.

5 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da tuberculose em primatas podem ser insidiosos, verificando-se apenas uma mudança comportamental, seguida por anorexia e letargia, ou então os animais podem simplesmente morrer de forma fulminante (RENQUIST; WHITNEY, 1978; FORTMAN et al.¹⁶, 2001 apud ALFONSO et al., 2004; FROST, 2006). Os animais que morrem de forma fulminante são geralmente encontrados em excelente estado corporal e à necropsia observam-se lesões viscerais miliares que podem estar disseminadas (RENQUIST; WHITNEY, 1978).

Outros sinais são tosse, dispneia, perda de peso inexplicável, pelos arrepiados, depressão, diarreia, linfadenopatia localizada ou generalizada, supuração de linfonodos, ascite, esplenomegalia, hepatomegalia, abscessos

¹⁶FORTMAN, J. D.; HEWETT, T. A.; BENNETT, B. T. **The laboratory nonhuman primate**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001.

cutâneos, espondilites e osteomielites (Figura 8) (RENQUIST; WHITNEY, 1978; RENQUIST; POTKAY, 1979; MONTALI et al., 2001; FROST, 2006). Feridas supuradas (Figura 9), com linfadenopatia localizada, devem ser sempre consideradas como um possível sinal de infecção por micobactéria (MONTALI et al., 2001). Sinais clínicos neurológicos, como paresia, podem ser resultantes da espondilite micobacteriana (FROST, 2006).

Devido à inespecificidade dos sinais clínicos, que podem ser observados também em casos de neoplasias, micoses sistêmicas, melioidoses (infecção por *Pseudomonas pseudomallei*), nocardioses, ascaridíase pulmonar, enterites bacterianas ou parasitárias, má nutrição e trauma (RENQUIST; WHITNEY, 1978; MONTALI et al., 2001; FROST, 2006), recomenda-se fazer o diagnóstico diferencial e

testes laboratoriais complementares (RENQUIST; WHITNEY, 1978).



Figura 8 – Fêmur de macaco com osteomielite crônica causada por tuberculose
Fonte: IALEGGIO, 1997



Figura 9 - Abscesso cutâneo na região femoral de macaco *Aotus* decorrente de infecção por tuberculose
Fonte: IALEGGIO, 1997

7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Embora uma significativa redução na incidência de tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro seja verificada em alguns países, como nos Estados Unidos, onde há uma legislação rígida regulamentando as medidas de controle e prevenção da tuberculose nesses animais, surtos continuam a ocorrer gerando significativas perdas econômicas, com a morte de animais e os custos com o controle da doença, além do risco de transmissão para os outros animais e para o homem (BUSHMITZ et al., 2009).

O diagnóstico clínico *ante-mortem* é geralmente difícil e problemático, devido aos sinais inespecíficos da doença. Por isso, muitas vezes é apenas no exame *post-mortem* que se visualizam as lesões sugestivas da enfermidade. Assim, a utilização de outras ferramentas para o diagnóstico da doença é importante, como os testes tuberculínico e sorológicos, exames

baseados em imagens do tórax e abdômen, isolamento do agente e testes moleculares para detecção e identificação do agente (McMANAMON, 2008; WALSH et al., 1996; IALEGGIO, 1997; LERCHE et al., 2008; LIN et al., 2008; BUSHMITZ et al., 2009).

Os exames mais utilizados são o teste tuberculínico, principalmente em programas de prevenção e quarentena, e o isolamento em meios de cultura artificiais, seguido da identificação por métodos moleculares. Embora o teste tuberculínico intradérmico ainda seja o principal teste de diagnóstico da tuberculose em primatas, sua incapacidade em identificar com segurança animais com infecção latente permanece um grave problema, estimulando a investigação científica para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de outros testes, como os moleculares e os sorológicos, na tentativa de aumentar a especificidade e a sensibilidade do procedimento,

diminuindo, assim, os resultados falsos, que implicam na não detecção de animais infectados e na eutanásia de animais sadios (WALSH et al., 1996; LERCHE et. al., 2008; LIN et al., 2008; McMANAMON, 2008).

6.1 Métodos de Diagnóstico Indireto

Testes indiretos são aqueles baseados na detecção da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro contra o agente infeccioso.

6.1.1 Teste de tuberculinização intradérmico

O teste tuberculínico pesquisa a hipersensibilidade tardia através da inoculação intradérmica de tuberculina. É o principal teste de diagnóstico *in vivo* da tuberculose em primatas não humanos. A tuberculina pode ser definida como um extrato obtido a partir de cultivos filtrados de *Mycobacterium* sp., previamente

esterilizados pelo calor, utilizada com o propósito de medir a reação de hipersensibilidade tardia causada pela infecção por micobactérias. Existem dois tipos de tuberculinas: *mammalian old tuberculin* (MOT), que é um extrato bruto preparado a partir de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, desenvolvida por Robert Koch, em 1890, e os derivados proteicos purificados (PPD, *purified protein derivative*), que foram desenvolvidos por Seibert, em 1934, e são preparados a partir de *M. bovis* (PPD mamífero) e *M. avium* (PPD aviário), nos quais as proteínas são separadas do meio de cultura por precipitação, purificadas por lavagens com ácidos e fosfatos e diluídas na concentração de uso (FROST, 2006; LAGE et al., 2006; BUSHMITZ et al., 2009). No Brasil, o PPD mamífero é produzido a partir da amostra AN5 de *M. bovis*, contendo 1 mg de proteína por mL (32.500 UI) e o PPD aviário é produzido a partir da amostra D4 de *M. avium*, contendo 0,5 mg de

proteína por mL (25.000 UI). Se mantidas sob a temperatura de 2° a 8° C e protegidas da luz solar direta, as tuberculinas têm validade de um ano após a data de fabricação. Uma vez aberto um frasco de tuberculina, seu conteúdo deve ser utilizado num único dia, descartando-se eventuais sobras. O PPD bovino apresenta-se sob a forma líquida incolor, e o PPD aviário, sob a forma líquida de coloração vermelho-claro (LAGE et al., 2006).

A inoculação de tuberculina induz o desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade tardia contra o antígeno micobacteriano. Em primatas, esse tipo de hipersensibilidade se desenvolve dentro de três a quatro semanas após a infecção. A fração protéica da tuberculina é reconhecida por linfócitos T sensibilizados, causando a liberação de citocinas e infiltração celular local, provocando edema, endurecimento da pele e eritema. A amplitude da

resposta de hipersensibilidade depende do número de bacilos, da quantidade de células T circulantes e da quantidade de antígenos específicos usados na preparação da tuberculina (FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2009).

Internacionalmente, muitos autores preconizam a utilização do teste de tuberculinização usando MOT, pois o PPD, devido à baixa concentração de antígenos, pode aumentar a chance de resultados falsos negativos em primatas (IALEGGIO, 1997; LERCHE et al., 2008). A MOT é menos purificada, contém mais unidades de tuberculina do que o PPD e tem mostrado maior reatividade em animais infectados (FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2009). O teste tuberculínico, utilizando como antígeno a MOT, tem sido o principal teste de diagnóstico para tuberculose em primatas há mais de 60 anos em muitos países, inclusive nos Estados Unidos.

Entretanto, outros autores recomendam a utilização do PPD, argumentando que a MOT é um produto de difícil padronização, podendo variar entre os lotes e desencadear reações inespecíficas em animais não infectados. O PPD, por seu turno, é padronizado com facilidade (THOEN; GARCIA-MARIN ¹⁷ , 2002 apud KANEENE; THOEN, 2004; MILLER, 2008). A MOT, por ser uma preparação resultante de cultura bruta filtrada, que contém antígenos comuns para várias espécies de micobactérias, incluindo aquelas não tuberculosas, pode originar reações cruzadas, diminuindo a especificidade do teste, ou seja, aumentando o número de reações falsos positivas. Além disso, a produção comercial de MOT é um processo lento e o produto

¹⁷ THOEN, C. O.; GARCIA-MARIN, J. F. *Mycobacterium*. In: **Compendium of animal production**. Wallingford, Oxon, UK: CAB International Publishing Inc., 2002. [CD-ROM].

resultante, embora essencial para programas de vigilância de primatas, não é rentável. Como resultado, nos EUA há apenas uma empresa fabricante da MOT (Synbiotics, Inc.) (IALEGGIO, 1997; LERCHE et al., 2008). No Brasil, não há disponibilidade no mercado da MOT, apenas do PPD (LAGE et al., 2006).

O teste tuberculínico é realizado inoculando-se, por via intradérmica, 0,1 ml de tuberculina na pálpebra superior próxima à sua borda, ou então na pele do abdômen, ou em ambos os locais. Em animais pequenos, pode-se utilizar 0,05 ml de tuberculina. A pálpebra é o local de preferência para a inoculação da tuberculina (Figura 10), pois é de fácil observação. Quando o teste for realizado no abdômen, os pelos devem ser raspados sem que a pele seja traumatizada, e o local da inoculação deve ser marcado para que se possa fazer a leitura da reação. A utilização do abdômen como local da inoculação é

recomendada em animais pequenos, como em saguis e micos, quando a inoculação das pálpebras for difícil devido ao tamanho (IALEGGIO, 1997; BUSHMITZ et al., 2009). Braços e tórax também podem ser utilizados para a inoculação (MILLER, 2008). Não se recomenda a antisepsia do local da inoculação com álcool isopropílico, pois algum álcool remanescente poderá ser introduzido no ponto de inoculação durante o procedimento e gerar um resultado falso positivo (IALEGGIO, 1997).

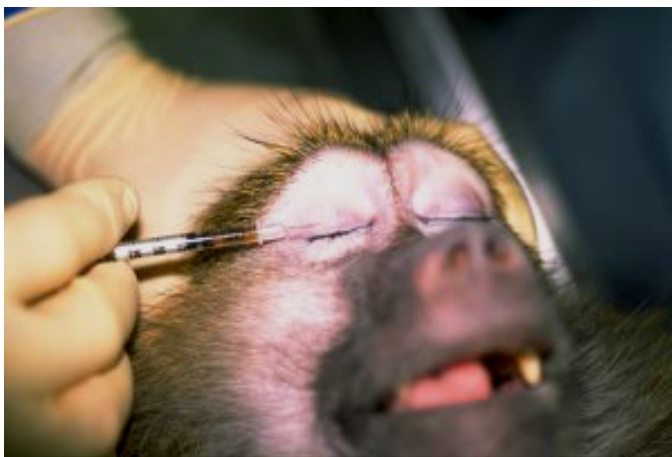


Figura 10 - Inoculação intradérmica de tuberculina em pálpebra de macaco. Fonte: UNIVERSITY OF CINCINNATI, 2011

Em decorrência da baixa especificidade das provas de tuberculinização simples, nas quais somente o PPD mamífero é utilizado, vários pesquisadores têm recomendado o uso da prova comparada de tuberculinização, na qual são utilizados dois sítios de inoculação diferentes e homólogos para a aplicação do PPD mamífero e do PPD aviário (IALEGGIO, 1997; CAPUANO et al., 2003). Observa-se que os animais acometidos por *M. bovis* ou *M. tuberculosis* reagem de forma semelhante à tuberculina mamífera (IALEGGIO, 1997; CAPUANO et al., 2003; FERREIRA NETO et al., 2014). As reações devem ser observadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação das tuberculinas. O resultado advém das alterações observadas no local, como presença de edema e eritema, ocasionando dificuldade para abrir os olhos (Figura 11), podendo chegar à necrose da região, todas decorrentes da hipersensibilidade tardia. Considera-se o animal positivo quando as

alterações forem observadas no local de inoculação do PPD mamífero. O resultado é considerado inconclusivo ou suspeito quando houver um pequeno edema com ou sem eritema. Se as alterações no sítio de inoculação do PPD aviário forem mais intensas do que no local de inoculação do PPD mamífero, considera-se o animal negativo. Em animais anérgicos, tem-se encontrado uma reação de hipersensibilidade transitória positiva, conhecida como reação *flash*, dentro das 24 horas após a inoculação, que depois se torna negativa nas leituras às 48 e 72 horas; por isso, é importante que se observem as alterações a cada período. É aconselhável que o mesmo indivíduo faça todas as leituras e interprete o teste (KING, 1993; IALEGGIO, 1997; CAPUANO et al., 2003).



Figura 11 - Macaco rhesus (*Macaca mulatta*) com reação positiva ao teste tuberculínico na pálpebra superior esquerda, apresentando inchaço e eritema
Fonte: SHIPLEY et al., 2008

O resultado do teste depende da capacidade do sistema imunológico do animal em produzir uma resposta celular contra a infecção (FROST, 2006). A detecção de animais positivos é dificultada em estágios mais recentes ou mais avançados da infecção, podendo ocorrer resultados falsos negativos. Em estágios mais recentes, a resposta mediada por células pode não

estar suficientemente desenvolvida, porque a sensibilização de linfócitos T é dependente da apresentação de antígenos processados pelos macrófagos ativados e antes desse processo de ativação a enfermidade é anérgica, ou seja, incapaz de estruturar uma resposta de hipersensibilidade tardia. Geralmente, o desenvolvimento da resposta celular dá-se em aproximadamente quatro semanas após a exposição à micobactéria. Além disso, em estágios mais recentes da infecção, o animal pode estar no período de latência, quando muitas vezes o teste tuberculínico não detecta o primata infectado (POTKAY et al., 1966; IALEGGIO, 1997; ISAZA, 2003; FROST, 2006). Há descrição de vários casos em que o animal recém-adquirido e com teste negativo durante a quarentena passa a ser positivo no período pós-quarentena, sem evidências de contato com humanos ou outros animais com tuberculose no novo local. A

hipótese mais provável é de que nesses casos tenha ocorrido reativação de infecções latentes, não detectadas durante os testes realizados na quarentena (LERCHE et al., 2008).

Em estágios mais avançados da doença ou em animais maciçamente infectados, pode ocorrer um esgotamento dos mecanismos imunológicos em decorrência da superexposição aos antígenos micobacterianos, ocasionando a anergia. Doenças concomitantes como sarampo, febre amarela ou infecções fúngicas, por causarem imunodepressão, podem provocar resultados falsos negativos à tuberculina (POTKAY et al., 1966; IALEGGIO, 1997; ISAZA, 2003; FROST, 2006). Indivíduos incapacitados de desenvolver resposta imune celular consistente, devido à terapia com drogas imunossupressoras ou isoniazida, idade avançada, período pós-vacinação contra poliomielite, também podem mostrar resultados falsos negativos, comprometendo os programas de

vigilância contra a doença (OTT, 1979; STALEY et al., 1995; IALEGGIO, 1997). Além disso, reações falso-negativas também podem resultar da incorreta execução do teste ou da utilização de antígeno com concentração abaixo da ideal (BUSHMITZ et al., 2009).

Reações falso-positivas podem resultar de prévia exposição ao adjuvante completo *De Freund* (emulsificado em óleo mineral contendo micobactérias neutralizadas e dessecadas, utilizado como um estimulador do sistema imunológico), trauma causado por inapropriada inoculação da tuberculina ou vacinação com BCG (DUKELOW; PIERCE, 1987; MALAGA et al., 2004; FROST, 2006). Reações inconclusivas podem ocorrer devido à exposição do animal a componentes fenólicos, que podem produzir reações alérgicas 30 minutos depois da inoculação. Além disso, a exposição a micobactérias atípicas ou saprófitas, como *M.*

gordoneae, pode resultar em reação falso-positiva (SOAVE et al., 1981; DUKELOW; PIERCE, 1987; MALAGA et al., 2004; FROST, 2006).

No grupo dos grupo dos grandes primatas, que inclui os chimpanzés (*Pan troglodytes*), orangotangos (*Pongo pygmaeus*) e gorilas (*Gorilla gorilla*), os orangotangos apresentam maior sensibilidade à tuberculina. Podem desenvolver sensibilização por antígenos de micobactérias não tuberculosas, gerando resultados falsos positivos (CALLE, 1999; FROST, 2006). Para essa espécie, é indicado fazer o teste comparativo em associação com outros testes para se confirmar o diagnóstico (CALLE, 1999).

Apesar de suas limitações, o teste tuberculínico ainda é o mais utilizado e recomendado para programas de prevenção e controle de tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro.

6.1.2 PRIMAGAM[®] (IFN- γ)

O PRIMAGAM[®], da Prionics AG, é um teste rápido, comercialmente disponível nos Estados Unidos, Nova Zelândia e Austrália, e utilizado para o diagnóstico de tuberculose em primatas. Nos Estados Unidos, o Departamento de Agricultura concedeu licença, em 2007, para que o PRIMAGAN[®] pudesse ser utilizado em *Cynomolgus* sp. e *Rhesus* sp. No Brasil, ainda não há a comercialização desse teste, sendo necessária sua importação (LERCHE et al., 2008).

O teste consiste na detecção e mensuração de interferon-gamma (IFN- γ), liberado quando os linfócitos T são estimulados *in vitro* com tuberculinas (PPD bovino e PPD aviário). IFN- γ é uma importante citocina envolvida na resposta imune mediada por células, tal como ocorre nas infecções por micobactérias (GARCIA et al., 2004; VERVENNE et al., 2004; LERCHE, 2007; LERCHE et al., 2008; LIN et al., 2008).

Alíquotas padronizadas de sangue total, coletadas em até 24 horas antes do processamento, são estimuladas com os antígenos micobacterianos em uma placa (PPD bovino e PPD aviário). Depois de incubação de 24 horas a 37° C e 5% de CO₂, em um ambiente umidificado, o sobrenadante de cada cultura é usado para medir a concentração de IFN- γ através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (LERCHE et al., 2008; LIN et al., 2008). Se a reação ao PPD bovino for maior que ao PPD aviário, o resultado deve ser interpretado como uma indicação de sensibilização por antígenos de *M. tuberculosis* ou *M. bovis*. Em caso contrário, o resultado deve ser interpretado como uma sensibilização ao *M. avium* ou outras espécies de micobactérias não tuberculosas. Esta última interpretação deve ser cautelosa, pois existe a possibilidade de alguns animais em estágios iniciais da infecção pelo *M. bovis* ou *M. tuberculosis* apresentarem uma reação

maior para o PPD aviário do que para o PPD bovino, sugerindo, nesses casos, a realização de mais de um único teste. Na maioria das vezes, testes subsequentes resultam em conversão no resultado, obtendo-se uma resposta dominante de IFN- γ para o PPD bovino. Para se evitar resultados falsos negativos, animais com reações mais fortes para o PPD aviário devem ser testados novamente após duas semanas (GARCIA et al., 2004; VERVENNE et al., 2004; LERCHE et al., 2008).

Esse procedimento foi utilizado durante um surto de *M. bovis* em *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*, obtendo-se uma sensibilidade de 68% e especificidade de 97%. Já o teste de tuberculinização intradérmica mostrou sensibilidade de 84% e especificidade de 87%. Nesse surto, a utilização de ambos os testes em paralelo detectou todos os animais infectados. Complementarmente, verificou-se que na espécie

M. fasciularis a produção de IFN- γ em resposta ao PPD bovino foi baixa, sendo especialmente recomendada para esta espécie a utilização do teste tuberculínico em paralelo ao PRIMAGAM[®] (GARCIA et al., 2004). Vários autores aconselham o uso combinado do PRIMAGAM[®] ao teste de tuberculinização intradérmica para aumentar a sensibilidade em programas de prevenção de tuberculose (LIN et al., 2003; LERCHE, 2007; BUSHMITZ et al., 2009).

Vários pontos críticos devem ser considerados em relação a esse teste. As amostras devem ser processadas dentro de 24 horas após a coleta. É um teste quantitativo e o estabelecimento do ponto de corte pode ser um problema quando espécies incomuns são testadas (LERCHE, 2007). Evidências mostram também que sua capacidade de detectar infecções latentes é incerta. Estudo feito em macacos *cynomolgus* mostrou incapacidade do teste para detectar tuberculose

latente (CAPUANO et al., 2003). Entretanto, o PRIMAGAM[®] tem algumas vantagens: só é necessário acessar o animal uma única vez para coletar o sangue; os resultados ficam prontos em menos de 36 horas, e pode-se repetir o teste sempre que necessário, pois os animais não são inoculados com antígenose, portanto, não precisam respeitar o período de dessensibilização (LERCHE et al., 2008).

6.1.3 ELISPOT (*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*)

O ELISPOT é um método em que células mononucleares de sangue periférico são isoladas e contadas, e uma quantidade destas células é colocada dentro de culturas específicas com vários antígenos (LIN et al., 2008). Cada cultura é revestida com uma membrana contendo anticorpos específicos anti-IFN- γ . Dessa maneira, o IFN- γ produzido é detectado diretamente sobre a

membrana, podendo-se estabelecer a quantidade liberada por cada célula (LIN et al., 2008).

Estudo envolvendo várias espécies de primatas, comparando o PRIMAGAN[®] e o ELISPOT ao teste tuberculínico, concluiu pela utilização dos testes em paralelo (VERVENNE et al., 2004).

Esse método de diagnóstico é ainda experimental, não existindo uma versão comercial (LERCHE et al., 2008).

6.1.4 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e outros testes sorológicos

ELISA é o teste sorológico mais comum para o diagnóstico de tuberculose. Vários antígenos micobacterianos são utilizados para a detecção de anticorpos. Os recentes avanços no sequenciamento genético do *M. bovis* e do *M. tuberculosis* têm identificado proteínas que

pertencem unicamente a estas espécies. Duas dessas proteínas, a ESAT-6 e a CFP-10, são altamente imunogênicas e utilizadas com frequência como antígenos para a detecção de anticorpos específicos contra tuberculose em primatas não humanos (LERCHE et al., 2008).

Em surto de *M. bovis* em macacos rhesus e cynomolgus, 22 dos 25 animais com lesão para tuberculose evidenciada à necropsia exibiram anticorpos específicos anti-ESAT-6, conferindo sensibilidade de 88% e especificidade de 84% para o ELISA, valores próximos ao do teste tuberculínico, que mostrou sensibilidade de 84% e especificidade de 84% (KANAUJIA et al., 2003). A elevação dos níveis de anticorpos no soro demora mais tempo para acontecer do que a resposta imune celular, que leva de três a quatro semanas para se estabelecer após a infecção. A detecção de anticorpos contra a ESAT-6, que é um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos,

geralmente ocorre em um a dois meses após o início da infecção. Por isso, embora os animais tenham a tendência a ser positivos para o teste de tuberculinização palpebral mais cedo do que no teste sorológico, os níveis de anticorpos permanecem elevados ao longo do curso da infecção, enquanto a reatividade do teste tuberculínico é intermitente ou deprimida (BRUSASCA et al., 2003). A persistência de anticorpos detectáveis ao longo da evolução da infecção sugere uma significativa melhora nos programas de vigilância da tuberculose, pois a utilização em paralelo do ELISA ou outro teste sorológico com o teste tuberculínico aumenta a sensibilidade do procedimento diagnóstico (LERCHE, 2007; LERCHE et al., 2008; MILLER, 2008).

Além do ELISA, outros testes estão sendo desenvolvidos para a detecção de anticorpos específicos contra as micobactérias em primatas

como o Western Blot (*Immunoblot*), MAPIA (*Multiantigen Print Immunoassay*), Prima-TB STAT-PAK[®] (LERCHE et al., 2008; McMANAMON, 2008; MILLER, 2008). O MAPIA e o Prima-TB STAT-PAK[®] não estão disponíveis para a comercialização no Brasil.

Immunoblot tem demonstrado ser um método sensível para detectar e monitorar o desenvolvimento de respostas sorológicas para antígenos proteicos de micobactérias em várias espécies animais (McMANAMON, 2008; MILLER, 2008).

O MAPIA foi desenvolvido pela Chembio Diagnostic Systems e implica na aplicação de vários antígenos purificados de *M. tuberculosis* em membranas de nitrocelulose, que são cortadas em múltiplas tiras, seguida por incubação com o soro testado e a detecção dos anticorpos para estes antígenos pelo Western Blot. A presença de uma banda visível é interpretada como resultado

positivo (McMANAMON, 2008; MILLER, 2008). Pode ser utilizado também como teste confirmatório para ELISA ou teste rápido para soros reativos. Além disso, ensaios com múltiplos antígenos fornecem uma ferramenta poderosa para a identificação de novas proteínas imunologicamente dominantes e podem identificar padrões de reatividade que são indicativos da progressão ou reativação da infecção (LERCHE et al., 2008). Embora MAPIA seja promissor, ele ainda não está disponível comercialmente (MILLER, 2008).

Prima-TB STAT-PAK[®] imunoensaio é um teste rápido de fluxo lateral, desenvolvido pela Chembio Diagnostic Systems para o sorodiagnóstico de tuberculose em primatas. Foi licenciado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos para ser usado em macacos rhesus, cynomolgus e outras espécies de primatas, mas ainda não está disponível comercialmente,

podendo ser utilizado somente por laboratórios autorizados pelo serviço veterinário oficial (LYASHCHENKO et al., 2007). É um teste de fácil execução e pode pesquisar anticorpos em soro, plasma ou outros fluidos corporais, sendo bastante versátil (LERCHE, 2007; BUSHMITZ et al., 2009). Na avaliação de três diferentes espécies de primatas experimentalmente infectadas com *M. tuberculosis*, o teste mostrou sensibilidade de 90% e especificidade de 99% (LYASHCHENKO et al., 2007).

O procedimento emprega uma ordem seletiva de antígenos proteicos recombinantes de *M. tuberculosis*, que ficam impregnados em uma única tira do teste, e que avalia presença de anticorpos para estes antígenos nas amostras testadas. O resultado pode ser obtido em 20 minutos e requer um pequeno volume de soro (30 µl), plasma ou sangue total. O teste é montado sobre um suporte plástico, sendo semelhante, na

aparência, com o teste de gravidez para humanos (Figura 12). A combinação em paralelo do teste Prima-TB STAT-PAK[®] ao teste tuberculínico parece ser uma abordagem diagnóstica confiável para a detecção de tuberculose em primatas (LERCHE, 2007; BUSHMITZ et al., 2009).

Concluindo, como os testes baseados na detecção de anticorpos apresentam resultados positivos ao longo de toda a evolução da doença, enquanto os testes baseados na resposta imune mediada por células são positivos apenas durante um período, é indicado usar ambos os testes, em paralelo, para detectar animais infectados com tuberculose ativa e latente (LERCHE et al., 2008). Portanto, o aprimoramento dos testes indiretos é essencial para aumentar a capacidade de detecção de animais infectados e assim melhorar significativamente a eficiência dos programas de vigilância de tuberculose em primatas mantidos em cativeiro.

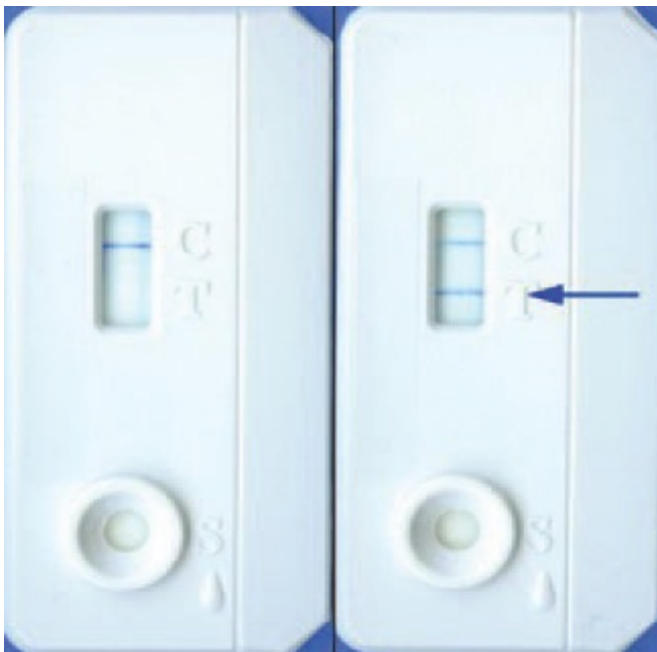


Figura 12 - Teste Prima-TB STAT-PAK[®]. A figura da esquerda representa resultado negativo e a da direita positivo; na janela do teste, a linha mais acima, presente em ambos os lados, é a banda controle; a linha mais abaixo (seta) é a banda que indica resultado positivo

Fonte: LYASHCHENKO et al., 2007

6.2 Métodos de Diagnóstico Direto

Testes Diretos demonstram a presença do agente etiológico por meio de seu isolamento e identificação ou da detecção do seu DNA.

6.2.1 Métodos de coloração em lâminas e cultivo bacteriano

As amostras que podem ser utilizadas para a realização do esfregaço/decalque e/ou cultura são: secreções nasais, suabe de garganta, lavagem gástrica, lavagem traqueal ou broncoalveolar, demais secreções e excreções, e amostras de órgãos e tecidos com lesões sugestivas (CORCORAN; THOEN, 1991; MILLER, 2008; BUSHMITZ et al., 2009). O lavado gástrico deve ser realizado pela manhã, logo após o ciclo noturno, pois durante o sono os animais tendem a ingerir as secreções vindas dos pulmões e assim ficam contidas dentro do conteúdo gástrico. Um tubo nasogástrico é introduzido no animal e o conteúdo gástrico é retirado, logo em seguida, é

adicionado um *buffer* neutralizante para otimizar a viabilidade das micobactérias para a cultura (LIN et al., 2008).

O procedimento, manuseio e transporte das amostras devem ser cuidadosos e biosseguros, tendo em vista o risco de exposição do operador (FROST, 2006).

Recomenda-se que as amostras sejam mantidas sob refrigeração por até 48 horas, ou sob congelamento quando o período transcorrido desde a coleta até o processamento em laboratório exceder este tempo.

Uma vez no laboratório, alíquotas das amostras podem ser transferidas para lâminas na forma de esfregaços ou decalques e coradas por métodos específicos para a observação direta do agente. A parede celular das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* contém ácido micólico, permitindo que sejam tingidas por corantes básicos, o que lhes confere a característica álcool-

ácido resistente. Porém, a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) não é conclusiva (FROST, 2006).

Há três métodos de coloração de bacilos álcool-ácido resistentes: o método fluorocromo de Truant (corantes fluorescentes auramina-rodamina), o de Ziehl-Neelsen (Figura 13) e o de Kinyoun (carbofucsina) (FROST, 2006; MILLER, 2008; BUSHMITZ et al., 2009; MURRAY et al., 2009).

As amostras são examinadas ao microscópio óptico ou ao microscópio de fluorescência, quando da utilização de corantes fluorescentes. A coloração álcool-ácido resistente é fácil e rápida, mas tem limitações: há necessidade de um grande número de bacilos na amostra para que o teste seja positivo e existem outras espécies de bactérias que também possuem esta característica, como a *Nocardia*. Portanto, as técnicas de coloração sempre devem ser

complementadas pelo cultivo bacteriano e posterior identificação do isolado (FROST, 2006; MILLER, 2008; BUSHMITZ et al., 2009; MURRAY et al., 2009).

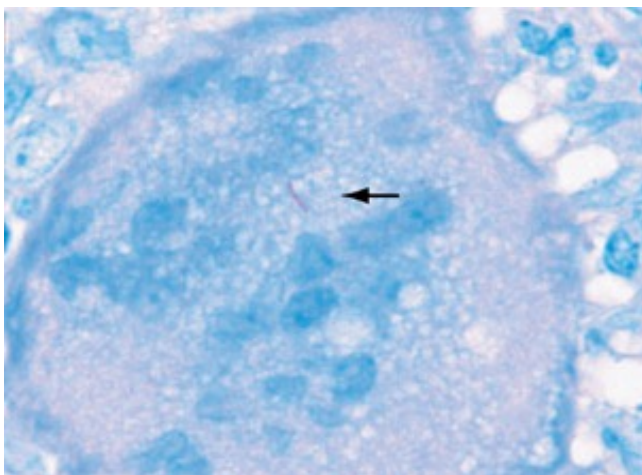


Figura 13 - Célula gigante multinucleada com bacilo álcool-ácido resistentes (seta); coloração Ziehl-Neelsen em tecido pulmonar de macaco rhesus infectado por *M. tuberculosis*
Fonte: LEWINSOHN et al., 2006

O isolamento de micobactérias depende da qualidade da amostra e do seu adequado

processamento em laboratório (FROST, 2006). O isolamento e identificação do agente é o padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose; porém é demorado, pois as bactérias do Complexo *M. tuberculosis* são nutricionalmente muito exigentes, crescendo lentamente e dividindo-se apenas a cada 12-24 horas, podendo levar de três a oito semanas em incubação a 37° C para se isolar o agente (MURRAY et al.¹⁸, 1998 apud KANEENE; THOEN, 2004; MILLER, 2008; MURRAY et al., 2009). O laudo negativo só é expedido após 60 dias de incubação.

Os meios de cultura precisam ter fontes de carbono, de nitrogênio, elementos inorgânicos e verde de malaquita para inibir contaminantes. Embora o *M. bovis* e o *M. tuberculosis* sejam

¹⁸ MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Mycobacterium*. In: _____. **Medical microbiology**. 3rd ed. St Louis: Mosby Year Book Inc., 1998. p. 319-330.

similares, apresentam especificidades em relação ao cultivo em meios artificiais (FROST, 2006). Diferentemente do *M. tuberculosis*, o *M. bovis* exibe baixo ou nenhum crescimento em meio de cultura contendo mais do que 1% de glicerol, sendo necessária a utilização de meio de cultura que tenha como fonte de carbono o piruvato de sódio no lugar do glicerol, denominado Stonebrink. Além disso, o *M. bovis* não reduz nitrato e apresenta resultado negativo para o teste da niacina. Para as outras micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*, os meios mais utilizados são o Löwenstein-Jensen, à base de ovo, e o Middlebrook, à base de ágar (ABRAHÃO, 1998; FROST, 2006).

6.2.2 Técnicas moleculares

Os métodos moleculares de diagnóstico representaram um grande avanço no diagnóstico da tuberculose no meio veterinário, pois

proporcionaram importantes conquistas em sensibilidade, especificidade e capacidade de revelar quantidades muito pequenas de bacilos, mesmo que estejam mortos, além de consumirem menos tempo que a bacteriologia clássica. Adicionalmente, permitiram rastrear as fontes de infecção pela comparação das características moleculares das estirpes isoladas. Entretanto, ainda estão restritos a um pequeno número de laboratórios especializados (ROCHA et al., 2013b).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) pode detectar DNA dos bacilos da tuberculose nas mais diferentes amostras, incluindo tecidos fixados com formalina, e tem a vantagem de ser mais rápida do que os métodos convencionais de cultura bacteriana (CORCORAN; THOEN, 1991; MILLER, 2008; BUSHMITZ et al., 2009).

A PCR pode ser realizada diretamente na amostra clínica, detectando o Complexo *M.*

tuberculosis, ou pode ser utilizada para a identificação de isolados. Neste caso, os isolados de BAAR são submetidos à técnica *TB Multiplex PCR* (WILTON; COUSINS, 1992) e aqueles classificados como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, são submetidos ao *RD Multiplex PCR* (RD9 e RD12) (WARREN et al., 2006), o qual discriminará o *M. bovis* dos outros membros do complexo *M. tuberculosis*.

Além da identificação da espécie da micobactéria, os métodos moleculares permitem discriminar isolados de uma mesma espécie, como o *Spoligotyping* e o MIRU (*Mycobacterial Interpersed Repetitive Units*), que discriminam isolados de *M. bovis* (KAMERBEEK et al., 1997; SUPPLY et al., 2000) e o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que discrimina isolados de *M. tuberculosis* (VAN EMBDEN et al., 1993; HARRIS, 2006).

O *Spoligotyping* requer de um a dois dias e é utilizado sobretudo para discriminação de isolados de *M. bovis*. Além disso, em certa medida, permite também a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Esse método se baseia na amplificação, pela PCR, do DNA presente no *locus* denominado região de repetição direta denominado de região de repetição direta DR (*Direct Repeat*). Essa região está presente exclusivamente no genoma das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*, notadamente no genoma do *M. bovis*. É um dos métodos mais utilizados para discriminar isolados de *M. bovis* em espoligotipos, constituindo importante ferramenta para a investigação da origem de surtos (KAMERBEEK et al., 1997; ROCHA; FERREIRA NETO, 2014).

O MIRU é composto por *loci* encontrados dentro do genoma das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*, que contém uma sequência

repetida de pares de bases em minissatélites e são similares às sequências descritas no genoma humano e de animais, denominadas *locus* VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*). Os MIRUs estão dispersos em regiões intergênicas do genoma do Complexo *M. tuberculosis* e possuem de 40 a 100 pb. (SUPPLY et al., 1997; SUPPLY et al., 2000). Baseia-se na análise dos produtos amplificados, permitindo verificar o tamanho dos fragmentos amplificados e a quantidade de repetições dos *loci*. É também um dos métodos mais utilizados para a discriminação de isolados de *M. bovis* (SUPPLY et al., 1997; SUPPLY et al., 2000; BARNES; CAVE, 2003).

O método RFLP é considerado o padrão-ouro para a diferenciação de isolados de *M. tuberculosis*, avaliando a presença da sequência de inserção IS6110 pela detecção do polimorfismo dos fragmentos de restrição. Ultimamente, tem sido substituído por métodos menos complexos.

Em um estudo realizado em 68 primatas não humanos do “Novo Mundo” (*Saguinus* sp., *Ateles* sp., *Cebus* sp., *Saimiri* sp.) no zoológico de Cali, na Colômbia, foram coletadas amostras de lavado bronquial, lavado gástrico e sangue destes animais. Essas amostras foram processadas para tentativa de isolamento, histopatologia com coloração por Ziehl Neelsen, PCR e RFLP. Dos 68 animais, cinco foram positivos para *M. tuberculosis* na PCR, dos quais três apresentaram cultura positiva para *M. tuberculosis* e dois exibiram a presença de bacilos álcool-ácido resistentes. Nenhum dos animais positivos apresentava sinais da doença (ALFONSO et al., 2004).

Apesar da importância dessas técnicas e de sua relativa difusão entre os laboratórios de diagnóstico, ainda não estão sendo utilizadas em larga escala na rotina de vigilância das instituições mantedoras de primatas (LERCHE et al., 2008).

A melhor estratégia para o diagnóstico direto da tuberculose animal é a combinação entre o isolamento pelos métodos bacteriológicos clássicos e a identificação e discriminação dos isolados pelos métodos moleculares.

6.3 Imagens

A radiografia do tórax é um método de diagnóstico que auxilia na detecção de anormalidades que podem ser indicativas da doença, mas não deve ser usado como diagnóstico definitivo, pois existem outras doenças que possuem as mesmas características radiográficas que a tuberculose, como a infecção por *Nocardia* spp. Além disso, esse exame complementar facilita a identificação de animais com teste tuberculínico negativo por imunossupressão associada à doença fulminante. As lesões nos pulmões variam de tamanho, formato, densidade e presença de cavitação, nas quais grandes

granulomas ou áreas com cavitação geralmente são visualizadas radiograficamente. Devido à rara calcificação nos granulomas em primatas, a imagem radiográfica destas formações frequentemente aparece menos evidenciada se comparada a de outros animais e humanos. O aumento de tamanho dos linfonodos bronquiais, que normalmente estão encobertos pela silhueta cardíaca, pode ser um sinal inicial de tuberculose pulmonar (CORCORAN; THOEN, 1991; FROST, 2006; LEWINSOHN, 2006; BUSHMITZ et al., 2009).

A radiografia e o ultrassom abdominais também podem ser utilizados como exames complementares, auxiliando na identificação ou confirmação de esplenomegalia e/ou linfadenopatia mesentérica e outras alterações indicativas da presença de infecção na região.

A tomografia computadorizada também é uma ferramenta de diagnóstico por imagem que

ajuda na detecção das lesões, detalhando a evolução da doença (CORCORAN; THOEN, 1991; FROST, 2006; LEWINSOHN, 2006; BUSHMITZ et al., 2009).

6.4 Necropsia e Achados

Microscópicos

As lesões características da tuberculose frequentemente são detectadas apenas no exame *post-mortem*. Geralmente, os órgãos mais afetados são os pulmões (Figura 14), seus linfonodos adjacentes e os tecidos linfáticos associados ao trato gastrointestinal, dependendo da porta de entrada da infecção. Secundariamente, pode ocorrer disseminação para o baço, fígado, rim e tecidos linfáticos associados. Ovário, cérebro, coluna espinhal, linfonodos periféricos, pele e glândula mamária também podem apresentar granulomas, porém com menor frequência (RENQUIST; WHITNEY, 1978; KING, 1993;

CAPUANO et al., 2003; ISAZA, 2003; KANEENE; THOEN, 2004; FLYNN, 2006; FROST, 2006).

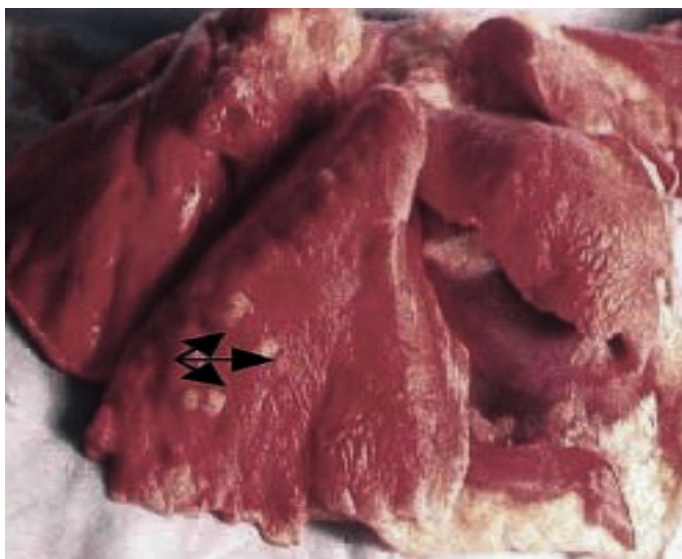


Figura 14 - Pulmão de macaco rhesus com granulomas (setas)

Fonte: GORMUS et al., 2004

A extensão das lesões pode variar de nenhuma lesão detectada macroscopicamente para uma larga disseminação de granulomas, que

assumem uma coloração esbranquiçada, amarelada ou acinzentada, de consistência macia a friável, dependendo do grau de calcificação existente e variando de um único ponto para grandes lesões coalescentes. Nos linfonodos que drenam a região afetada também são encontrados nódulos caseosos. Em áreas onde o pulmão afetado está em contato com a pleura parietal, podem ocorrer aderências, assim como em outros tecidos comprometidos e as respectivas serosas adjacentes, tais como o mediastino, peritônio e mesentério. As lesões encontradas devem ser colhidas para exames histopatológicos e bacteriológicos. As destinadas à histopatologia devem ser fixadas em formol e aquelas remetidas para a bacteriologia devem ser conservadas por congelamento (-20° C) ou por simples refrigeração, quando o tempo entre colheita e processamento em laboratório não exceder 48 horas (KING, 1993; ISAZA, 2003; FROST,

2006). Para as amostras *in natura* devem ser utilizadas embalagens herméticas e observados os cuidados de biossegurança.

À necropsia, se possível, a tuberculose deve ser diferenciada de outras doenças granulomatosas, como a nocardiose, micoses, protozooses (*Hepatocystis kochi*), parasitoses (*Pneumonyssus simicola*) e também das causadas por corpos estranhos (granulomas decorrentes da administração de caulim). As lesões desencadeadas por parasitas são facilmente distinguíveis microscopicamente das lesões consequentes à infecção micobacteriana. Além disso, as lesões produzidas por *Nocardia* spp. possuem predominância de neutrófilos e são purulentas ou piogranulomatosas, diferentemente do que é observado em um típico granuloma tuberculoso (KING, 1993).

Os achados microscópicos em animais com tuberculose podem variar de acordo com a

duração e extensão da doença. Nos estágios iniciais, podem ser encontrados alguns granulomas microscópicos dispersos, constituídos por células epitelioides e ocasionalmente células de Langhans, podendo existir uma coleção de neutrófilos no centro de algumas lesões pequenas. A coloração Ziehl-Neelsen revela a presença de bacilos álcool-ácido resistentes no interior das células epitelioides apenas quando existe uma infecção massiva. Inicialmente, essas lesões estão restritas aos pulmões ou ao trato gastrointestinal, que representam as duas portas de entrada mais frequentes do bacilo da tuberculose. Nesse estágio, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com *Nocardia* spp., que exibe algumas similaridades com infecção micobacteriana recente: também é um bacilo álcool-ácido resistente e desencadeia lesões com predominância de neutrófilos. Em estágios mais avançados da doença, o granuloma característico

da tuberculose é constituído por uma área central com restos celulares necrosados, cercados por uma zona de células epitelioides e células gigantes de Langhans, sendo que algumas vezes a porção central pode estar parcialmente calcificada, lembrando que a calcificação é rara em primatas. A periferia do granuloma geralmente é constituída por certa quantidade de tecido fibroso e infiltrado de linfócitos (KING, 1993; FROST, 2006).

7 TRATAMENTO

Em animais doentes não é recomendável a terapia com antibióticos, principalmente em função da possibilidade de indução da multirresistência. Pessoas em contato prolongado com um animal tuberculoso possuem maior risco de infectar-se com micobactéria resistente. Assim, é recomendada a eutanásia de animais positivos ou com dois resultados inconclusivos ao teste tuberculínico (JOHNSON-DELANEY, 1994; FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2009).

Alguns autores sugerem o tratamento de animais de grande valor zootécnico ou sob o risco de extinção. Entretanto, o custo do tratamento é alto e existem questões de segurança que devem ser seguidas rigidamente em função do risco de transmissão da doença para os manipuladores do animal, para os outros animais da coleção e para o público visitante. Portanto, medidas de infraestrutura, que garantam o total isolamento do animal e a logística do tratamento devem estar

muito bem estabelecidas e compreendidas por toda a equipe envolvida no processo (WARD et al., 1985; WOLF et al., 1988; JOHNSON-DELANEY, 1994; BUSHMITZ et al., 2009).

Quando for plausível a opção pelo tratamento, devem ser administradas múltiplas drogas, como a combinação de isoniazida e estreptomicina, de isoniazida e ácido p-aminosalicílico, ou isoniazida, etambutol e rifampicina. Em todos os casos, para o sucesso no tratamento, o animal deve ser mantido isolado e deve ser feito o antibiograma para determinar a sensibilidade da micobactéria em relação aos antibióticos antes do início do tratamento. A terapia deve ser mantida por seis a doze meses, sem nenhuma interrupção. O tratamento pode resultar na diminuição da resposta para o teste tuberculínico, pois a isoniazida é imunossupressora. Assim, é aconselhável a realização do teste somente a partir de um mês

após o fim do tratamento (WARD et al., 1985; WOLF et al., 1988; JOHNSON-DELANEY, 1994; BUSHMITZ et al., 2009).

8 PREVENÇÃO

Programas de prevenção da tuberculose são essenciais nas instituições mantenedoras de primatas em cativeiro. O objetivo é reduzir a probabilidade de exposição desses animais à doença e detectá-la o mais brevemente possível, caso tenham sido expostos. Para tanto, é necessário o conhecimento da epidemiologia da doença e das características e rotinas do local onde essas medidas serão implementadas. Essas iniciativas se baseiam em três elementos fundamentais: observação de garantias sanitárias quando da introdução de novos animais no plantel, implementação de sistema de vigilância para tuberculose e adoção de medidas de biossegurança (KANEENE; THOEN, 2004; FROST, 2006).

As medidas de biossegurança são um conjunto de normas operacionais rígidas que devem ser seguidas por todos na instituição, sendo seus principais itens: práticas de quarentena e vazio sanitário; limpeza e desinfecção de fômites

e do ambiente; controle e armazenamento adequado dos alimentos oferecidos aos animais; monitoramento da saúde dos funcionários, especialmente dos que tenham contato com os animais; controle de animais sinantrópicos; destino adequado de lixo, excretas e carcaças; adequação dos recintos dos animais visando mitigar o risco de exposição à doenças que podem ser introduzidas pelos visitantes (CUBAS, 2008; OIE, 2014; SILVA; FELIPPE, 2014).

8.1 Introdução de Novos Animais

O risco de carrear patógenos causadores de zoonoses está relacionado à posição taxonômica e à origem das espécies em questão. Pode-se considerar que esse risco aumenta na seguinte ordem: prossímios, callitrichideos, outros macacos do “Novo Mundo”, macacos do “Velho Mundo” e os grandes primatas (orangotango, gibão, chimpanzé e gorila). O risco também é maior em

primatas capturados diretamente da natureza do que em animais criados em cativeiro, mantidos em ambiente controlado e sob supervisão veterinária (OIE, 2014).

Segundo o Código Sanitário para Animais Terrestres da OIE (World Organisation for Animal Health) (2014), as autoridades veterinárias dos países importadores devem requerer uma série de garantias para os primatas:

- a apresentação de certificado veterinário internacional, atestando que os animais: 1) foram individualmente identificados (os meios de identificação devem ser descritos no certificado); 2) foram examinados no dia do embarque e considerados saudáveis, livres de sinais clínicos de doenças contagiosas; 3) estavam em condições adequadas para o transporte. Adicionalmente, devem ser anexados os comprovantes de que nasceram no local de origem ou lá foram mantidos por

no mínimo dois anos, e também seus históricos individuais, incluindo vacinações, exames e tratamentos feitos antes do embarque;

- que são originários de instalações sob supervisão veterinária permanente, na qual é seguido um programa adequado de monitoramento de saúde, incluindo a execução de exames microbiológicos e parasitológicos, assim como necropsias.
- comprovação que nenhum caso de tuberculose tenha ocorrido em dois anos antes do embarque no local ou no recinto de onde o animal é proveniente;
- os animais devem ser transportados por via aérea, de acordo com os Regulamentos para o Transporte de Animais Vivos da Associação de Transporte Aéreo Internacional ou em condições equivalentes, se o transporte for feitos por outras vias (ferrovia ou rodovia);

- todos os animais que morrerem, por qualquer razão, devem ser submetidos a exame *post-mortem* em um laboratório de referência e a causa deve ser esclarecida antes que o grupo ao qual o animal pertencia seja liberado da quarentena.

A realização de testes tuberculínicos antes do transporte dos animais oriundos de criadores com controle veterinário é recomendável, pois diminuirá o risco de importação de primatas com a doença e reduzirá o requerimento de testes durante a quarentena (BUSHMITZ et al., 2009). A OIE (2014) recomenda que nos 30 dias anteriores ao embarque os animais sejam submetidos a testes para tuberculose em duas ocasiões, com um intervalo mínimo de duas semanas entre eles.

No Brasil, a legislação que regulamenta a aquisição de animais silvestres da fauna nacional e exóticos é composta portarias e decretos que seguem abaixo:

- Portaria nº 117, de 15 de outubro de 1997: os animais vivos da fauna silvestre brasileira poderão ser comercializados por criadouros e jardins zoológicos devidamente registrados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e por pessoas jurídicas que intencionarem adquirir animais e revendê-los a particular para dar início à criação comercial ou conservacionista, ou para aqueles que pretendam mantê-los como animais de estimação. Esses animais devem possuir sistema de identificação aprovado pelo IBAMA e a venda deverá ser acompanhada de nota fiscal. Para o transporte interestadual, o animal deverá estar acompanhado da nota fiscal e da Guia de Trânsito Animal (GTA) emitida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1997).

- Portaria nº 93, de 7 de julho de 1998, normatiza a importação e a exportação de espécimes vivos, produtos e subprodutos da fauna silvestre brasileira e da fauna silvestre exótica. A importação e a exportação somente poderão ser realizadas por pessoa jurídica de direito público ou privado e registrada junto ao IBAMA. A importação de animais vivos está sujeita também à autorização do MAPA, que se manifestará quanto às questões zoonosológicas; os estabelecimentos registrados no IBAMA como importadores devem possuir um quarentenário aprovado pelo MAPA. Os animais vivos somente poderão ingressar no país se identificados na origem utilizando sistema de identificação próprio, reconhecido pelo IBAMA (anilhas, tatuagens, identificação eletrônica), virem acompanhados de nota fiscal e das licenças. Não será autorizada a importação de animais

da fauna silvestre exótica proveniente de captura na natureza. A importação de espécimes vivos da fauna silvestre brasileira, somente será permitida se forem provenientes de reprodução em cativeiro, estiverem devidamente identificados na origem e mediante a apresentação de certificado que comprove sua origem legal e outras normas complementares. A importação de animais vivos de espécies listadas no Anexo I da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), somente será permitida para espécimes reproduzidos em cativeiro, devidamente identificados na origem e mediante a apresentação de certificado que comprove a origem legal dos animais e outras normas complementares da Convenção. A importação de animais vivos de espécies listadas no Anexo II da CITES,

reproduzidas em cativeiro, somente será efetivada mediante comprovação da identificação individual dos exemplares e apresentação da licença de exportação do país de origem (BRASIL, 1998).

- Decreto nº 3.607, de 21 de setembro de 2000, dispõe sobre a implantação da Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e da Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), ficando o comércio internacional de espécies e espécimes incluídas nos Anexos I, II e III da CITES sujeito às disposições contidas neste decreto. A comercialização dos animais contidos nos Anexos, I, II e III deve vir acompanhada das licenças de importação e exportação emitidas pela autoridade administrativa do país de origem, que no caso do Brasil é o IBAMA, e do certificado de origem. Deve ainda garantir

que os animais não sofreram nenhum risco com o transporte (BRASIL, 2000).

Como se pode observar, no Brasil não existem normas que regulamentem a aplicação da quarentena para animais importados ou movimentados entre instituições dentro do país.

8.2 Quarentena

A aplicação dos procedimentos de quarentena, no momento em que o animal chega ao país ou a uma nova instituição, é indispensável para se avaliar sua saúde e prevenir a introdução da tuberculose. Em geral, o programa leva em conta o potencial zoonótico dos primatas e depende das informações disponíveis sobre os animais. É constituída basicamente por isolamento dos animais recém-adquiridos, avaliação clínica, testes de diagnóstico e proteção das pessoas envolvidas (BUSHMITZ et al., 2009; OIE, 2014).

Os grupos de quarentena deverão ser estabelecidos levando-se em consideração as espécies, a condição de saúde, procedência e a data de chegada no quarentenário, sendo o início do período definido como o dia da entrada do último animal no recinto. Os animais de mesma origem deverão estar agrupados no transporte e não misturados com outras espécies. O grupo de quarentena será formado assim que chegarem à instituição de destino. Todos os esforços devem ser feitos para manter os animais recém-adquiridos isolados e separados de acordo com a espécie, sendo que muitas vezes o espaço é um fator limitante para várias instituições. Outro aspecto que deve ser levado em conta no momento de formar os grupos inclui a idade dos animais e a história social, sendo os animais mais jovens mais suscetíveis à tuberculose (BUSHMITZ et al., 2009; OIE, 2014).

Para minimizar o risco de transmissão de doenças, a movimentação de animais durante a quarentena deverá ser evitada. Se for inevitável, depois de formado o novo grupo deve-se recomençar a contagem do período (BUSHMITZ et al., 2009; OIE, 2014).

Ocasionalmente, as instituições mantenedoras são solicitadas a aceitar primatas criados como animais de estimação. Essas instituições devem analisar as condições de espaço, disponibilidade de recursos e o efeito da introdução desse tipo de animal sobre a população existente, pois muitas vezes sua origem e seu histórico de saúde são desconhecidos (FROST, 2006).

A completa separação física dos grupos é importante para se evitar a transferência de agentes infecciosos de um grupo para o outro durante esse período (FROST, 2006; OIE, 2014). O local deve ser preparado antes da entrada dos

animais, sendo aconselhável manter um pequeno número por recinto e fornecer uma boa e eficiente condição ambiental (BUSHMITZ et al., 2009). Segundo a OIE (2014), os recintos devem ser projetados para permitir a manutenção segura dos animais e facilidade para execução de procedimentos de higiene e desinfecção, sumarizados abaixo:

- as paredes, tetos e chão devem ser resistentes à água para facilitar a higiene e a desinfecção, e durante estes procedimentos deve-se minimizar a formação de aerossóis e assim diminuir a disseminação de partículas infectantes. As imperfeições das superfícies devem ser corrigidas para facilitar a desinfecção;
- o lixo, os restos de alimentos e outros materiais potencialmente contaminados devem deixar a área lacrados e ser transportados para o local onde serão

descontaminados/esterilizados química ou fisicamente;

- as eventuais janelas devem ser fechadas e seladas, a menos que o recinto esteja suficientemente separado da área não quarentenária pela distância, cercas ou outros meios;
- o sistema de ventilação, no caso de salas, deve ser operado de maneira a assegurar o isolamento dos animais, além de garantir seu conforto e saúde. O ar de exaustão deve ser filtrado e eliminado longe dos edifícios e de outras áreas ocupadas. Sistemas de resfriamento, aquecimento e ventilação devem ser projetados para que sua operação possa ser contínua, mesmo em eventual interrupção da energia elétrica.

A área de quarentena deve conter, no mínimo, duas pequenas salas, separadas fisicamente, para a preparação do pessoal que

circula no local, sendo uma destinada à troca de roupa, calçados e equipamentos de proteção individual. e a outra. onde se encontram os armários e as pias para lavagem das mãos e os chuveiros para banho depois do contato com os animais. Os calçados devem ser lavados ao sair de cada recinto e das instalações da quarentena ou então trocados. Essas medidas previnem que ocorra o transporte de possíveis patógenos de um recinto para outro nas instalações. Os equipamentos apropriados à tarefa e um local para seu armazenamento e descontaminação devem estar disponíveis nessa área e não devem ser usados em outro local, sendo aconselhável que cada recinto possua seus próprios equipamentos (OIE, 2014). Deve existir um fluxo dentro desta área, com um local de entrada de material limpo e outro de saída para a área suja (ROBERTS; ANDREWS, 2008).

A OIE (2014) recomenda que existam regras para o acesso ao quarentenário e que na entrada desta área seja colocada uma placa de aviso de perigo, informando que pode ocorrer exposição a doenças infecciosas. Os nomes e telefones de contato das pessoas responsáveis devem ficar em local de fácil acesso e todos os requisitos especiais para entrar na área devem estar expostos. O pessoal envolvido deve ser qualificado e treinado periodicamente para detectar qualquer alteração nos animais, remover os resíduos de forma segura, tomar amostras e aplicar e interpretar testes de diagnóstico (FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2009; OIE, 2014).

Como é preciso no mínimo três semanas após a infecção para que o animal desenvolva uma reação de hipersensibilidade tardia, uma série de testes consecutivos é recomendada durante o período de quarentena para aumentar a possibilidade de se detectar animais recém-

infectados. A duração da quarentena deve ser de no mínimo 42 dias, com três testes tuberculínicos em intervalos de duas semanas, sendo que o primeiro teste deve ser realizado após um a dois dias ou até uma semana da chegada dos animais, para permitir que se recuperem do estresse do transporte e adaptem-se ao novo ambiente. Assim, eles podem ser anestesiados com segurança para a aplicação da tuberculina e também para o exame físico (CDC, 1993; ROBERTS; ANDREWS, 2008; BUSHMITZ et al., 2009). No caso de animais com resultados positivos ou suspeitos, os outros animais do recinto deverão permanecer por mais tempo em quarentena, sendo testados mais cinco vezes após a retirada do último animal positivo ou suspeito (CDC, 1993). Durante a quarentena, deve-se observar também o peso dos animais, que é um importante indicador para tuberculose. Este deverá ser monitorado periodicamente, e aqueles animais com perda

superior a 10% de seu peso corporal, ou animais jovens que não ganharem peso depois de 42 dias, deverão ser examinados e cuidadosamente avaliados (BUSHMITZ et al., 2009).

A duração mínima da quarentena pode ser prolongada até que todos os eventos que ocorreram durante este período sejam investigados e resolvidos, e que não exista mais nenhuma evidência de transmissão de agentes infecciosos dentro do grupo (OIE, 2014). O histórico e a documentação disponíveis sobre a saúde do animal também podem influenciar na duração e extensão do período de quarentena. Como regra, quanto menos informação disponível, mais longa e rigorosa deverá ser a quarentena (FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2009).

Animais originários da natureza e mantidos em cativeiro por um período antes da exportação são potenciais fontes de infecção, sendo que normalmente apenas uma quantidade

muito limitada de informações sanitárias pode ser dada pelo fornecedor e pela autoridade veterinária do país exportador (OIE, 2014). Nesses casos, antes da exportação dos animais, três testes negativos com intervalos de duas semanas, com o último teste não mais do que dez dias antes do embarque, deverão ser requeridos. O fornecedor deverá providenciar um certificado de saúde incluindo as datas da realização dos testes e os parâmetros clínicos avaliados. Esses documentos deverão acompanhar todos os animais exportados. Primatas provenientes de fornecedores que tenham relatado a doença ou significativa perda de animais não deveriam ser aceitos pelo importador (BUSHMITZ et al., 2009). Após a chegada dos animais ao local de destino, recomenda-se que sejam imediatamente alocados na estação de quarentena, por no mínimo doze semanas. Durante esse período, devem ser monitorados diariamente para sinais de doenças e, se necessário,

submetidos a exame clínico. Em próximos, macacos do “Novo Mundo”, macacos do “Velho Mundo”, gibões e grandes primatas o teste tuberculínico deve ser feito no mínimo três vezes em intervalos de duas a quatro semanas. Em saguis e micos, o teste deve ser realizado duas vezes com o mesmo intervalo. Os animais que morrerem, seja qual for a causa, devem ser submetidos a exame *post-mortem* e as causas devem ser esclarecidas antes de o grupo ao qual o animal pertencia seja liberado da quarentena. (OIE, 2014).

Segundo a OIE (2014), é necessário que o fornecedor comprove que o local de origem dos animais permaneceu livre da tuberculose nos dois anos anteriores ao embarque. Caso haja algum registro da infecção, o período de quarentena deve ser prolongado para 60 dias, incluindo dois testes tuberculínicos adicionais. Sempre que possível, é recomendado estender a quarentena para até três

meses. Em caso de um teste positivo, o respectivo animal será isolado e eutanasiado; o grupo remanescente deverá reiniciar as medidas de quarentena a partir daquele ponto (BUSHMITZ et al., 2009).

Antes da liberação dos animais da quarentena, todas as informações pertinentes ao grupo deverão ser analisadas, incluindo os documentos de transporte, certificados de saúde, dados do fornecedor, registros dos testes de tuberculose e registros individuais contendo os resultados de todos os procedimentos realizados durante a quarentena. Os animais deverão ser submetidos a um exame físico final e, se possível, deve-se utilizar a radiografia torácica e outros testes como exames complementares. A liberação só ocorrerá depois que o veterinário responsável verificar toda a documentação (BUSHMITZ et al., 2009).

Após a retirada dos animais da quarentena, os recintos, utensílios e equipamentos (pás, vassouras, comedouros, bebedouros etc.) deverão ser limpos e descontaminados (OIE, 2014).

8.3 Rotina de Testes Pós-Quarentena – Vigilância

A aplicação dos testes tuberculínicos nos primatas é recomendada durante o período pós-quarentena, principalmente em instituições onde mantêm contato próximo com humanos. Para babuíños, prossímios e macacos do “Novo Mundo” os testes devem ser aplicados semestralmente; para grandes primatas, anualmente, e para os demais, trimestralmente. Um local com pouca exposição dos animais aos humanos pode ter uma rotina de testes com intervalo de doze meses, dependendo da política da instituição. No caso de animais provenientes de instituição com menor frequência de testes para

tuberculose do que a aconselhável, o veterinário responsável da instituição de destino deve ser notificado (CDC, 1993; BUSHMITZ et al., 2009).

Se ocorrer resultados inconclusivos ou suspeitos ao teste tuberculínico, o animal tem de ser levado para a área de quarentena e todos aqueles pertencentes ao mesmo grupo deverão ser considerados como possivelmente infectados e, portanto, testados. Outras ferramentas de diagnóstico podem ser usadas, como radiografia de tórax, cultura bacteriana ou testes moleculares e sorológicos. Em caso de animais positivos, estes devem ser eutanasiados e encaminhados à necropsia. O recinto deve ser desinfetado e os animais remanescentes devem ser colocados em quarentena. Em ambos os casos, a quarentena terá duração de 90 dias, com rotina de testes tuberculínicos a cada duas semanas. Os animais serão considerados saudáveis quando completarem cinco testes sem nenhuma reação. O

primeiro teste deve ser administrado duas semanas depois da identificação do animal positivo, inconclusivo ou suspeito (CDC, 1993; BUSHMITZ et al., 2009).

É necessário que a instituição tenha um programa de registro individual de todos os animais existentes no local, contendo seu histórico e rotina de manejo. Assim, em um eventual surto é possível rastrear a origem, identificando as potenciais fontes de infecção, inclusive a possibilidade do envolvimento de outras instituições (FROST, 2006).

8.4 Estrutura, Limpeza e Desinfecção dos Recintos

As micobactérias são muito resistentes às condições ambientais, notadamente onde existe alta umidade, baixa temperatura e pouca incidência de luz solar, podendo permanecer no local por longos períodos (WHO, 1984; KING,

1993). Um recinto bem planejado, considerando esses aspectos sanitários, deve reduzir a concentração de agentes infecciosos, além de favorecer o bem-estar e o manejo dos animais.

Em instituições abertas à visitação pública, algumas medidas estruturais devem ser adotadas com a finalidade de diminuir a possibilidade de transmissão de infecções advindas do contato com os humanos visitantes, como a adoção de barreiras físicas – vidro, fosso etc. –, impedindo que objetos e alimentos potencialmente contaminados sejam arremessados para dentro dos recintos (MONTALI et al., 2001; SILVA; FELIPPE, 2014; FROST, 2006). Na década de 1930, a introdução de barreiras de vidros nos recintos dos primatas, em zoológicos na Europa e nos Estados Unidos,

reduziu a incidência da tuberculose nesses animais (RUCH¹⁹, 1959 apud MONTALI et al., 2001).

A limpeza e desinfecção dos recintos e equipamentos são procedimentos importantes dentro dos programas sanitários, pois ajudam a prevenir a disseminação do bacilo da tuberculose nas das instituições mantenedoras de animais selvagens. Os desinfetantes micobactericidas podem ser usados em instituições que abrigam primatas não humanos (BUSHMITZ et al., 2009), levando-se sempre em conta que as micobactérias também são muito resistentes a desinfetantes, sendo necessário conhecer a ação do produto (OIE, 2014). É recomendado que periodicamente seja feito um rodízio de princípios ativos para evitar o desenvolvimento de resistência. Uma equipe treinada é essencial para a realização

¹⁹RUCHT, C. **Disease of laboratory primates**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1959. p. 199.

dessas ações de limpeza e desinfecção (WHO, 1984).

Em primeiro lugar, deve-se realizar a limpeza, com a remoção do material orgânico e de outras partículas, permitindo, assim, que o princípio ativo desenvolva sua plena ação desinfetante (WHO, 1984). O material removido deve ser desinfetado antes do adequado descarte. A limpeza pode ser feita com o uso de detergentes como o fosfato trissódico ou carbonato de sódio, de preferência com água quente para o enxágue, evitando-se deixar resíduos que possam interferir na ação dos desinfetantes. Deve-se sempre tomar o cuidado em diminuir a formação de aerossóis durante esse procedimento (WHO, 1984).

Os desinfetantes com ação micobactericida recomendados são os compostos fenólicos, o ácido peracético, os derivados de aldeídos, compostos iodados e compostos clorados, sendo reservado aos álcoois o uso exclusivamente

ambulatorial, por serem inflamáveis (RUBIN, 1983; ASCENZI, 1996; RUSSELL, 1996; RUTALA; WEBER, 2004). Existe muita literatura científica a respeito da ação dos desinfetantes sobre micobactérias e pode-se observar que a eficiência destes é influenciada por diversos fatores como a concentração do produto, o pH e a dureza da água e a presença de material orgânico (WHO, 1984). Os fenóis são considerados estáveis e não são inativados pelo sabão nem pela matéria orgânica, sendo bastante empregados em locais com contaminação fecal, mas possuem ação irritante para as mucosas e são corrosivos (PRINDLE, 1983; SPAULDING et al., 1997;). Os compostos iodados, quando diluídos em água alcalina com grandes concentrações de sais de cálcio e magnésio (água dura), ou quando na presença de material orgânico têm sua atividade micobactericida diminuída (WHO, 1984). Os compostos clorados, dentre eles o hipoclorito de

sódio, têm sua atividade micobactericida discutida por diversos autores, sendo que alguns não recomendam sua utilização, pois sua eficiência é muito dependente do pH, concentração, temperatura e presença de matéria orgânica. Na ausência de matéria orgânica o hipoclorito mostra-se bastante eficiente na ação micobactericida (RUBIN, 1983; WHO, 1984; BEST et al., 1990). Dos derivados de aldeídos, o mais utilizado e estudado é o glutaraldeído, que também possui sua eficácia questionada sobre as micobactérias, sendo que alguns autores recomendam utilizá-lo em pH alcalino para aumentar sua atividade micobactericida, além de ser um produto irritante para as mucosas (MINER et al., 1977; RUSSEL, 1982; RUTALA; WEBER, 2004). O ácido peracético possui ampla atividade micobactericida, mesmo na presença de material orgânico, é hidro e lipossolúvel e, quando decomposto, gera produtos não tóxicos (ácido

acético, água e oxigênio), sendo vantajoso para o meio ambiente, mas possui alta ação corrosiva, sendo incompatível com materiais que contenham ferro, cobre e zinco, além de ter custo mais elevado. Existem formulações comerciais de misturas de ácido peracético, ácido acético e peróxido de hidrogênio, que não são corrosivas e possuem grande ação micobactericida (HOLTON et al., 1995; RUTALA; WEBER, 2004).

Os métodos físicos de descontaminação também podem ser utilizados. No caso das micobactérias, o calor acima de 60° C é suficiente para destruí-las. Nas instituições mantenedoras de primatas, tanto o aquecimento acima de 60° C, quanto a fervura ou a autoclavagem podem ser utilizados para a desinfecção de material orgânico (fezes, tecidos corporais etc.) e equipamentos. As micobactérias também são sensíveis à luz ultravioleta, sendo este método recomendado para a descontaminação de superfícies, pois seu poder

de penetração em materiais sólidos é reduzido (WHO, 1984).

Os locais onde animais positivos e/ou suspeitos forem identificados, devem ser interditados e submetidos a rigoroso processo de limpeza e desinfecção. As instalações e equipamentos, incluindo os bebedouros e comedouros, devem ser limpos e desinfetados em intervalos semanais, por pelo menos três vezes.

Importante reiterar que qualquer manipulação ou procedimento realizado deve ser feito cuidadosamente para minimizar a produção de aerossóis nos recintos (BUSHMITZ et al., 2009).

8.5 Monitoramento da Saúde dos Funcionários

A tuberculose, assim como outras doenças, pode ser transmitida entre humanos e primatas. Portanto, as instituições mantenedoras desses

animais devem implantar programas personalizados de controle da saúde dos funcionários, que devem ser continuamente avaliados quanto à sua eficácia (FROST, 2006; OIE, 2014).

Um programa de prevenção deve incluir procedimentos operacionais padronizados, com foco na cadeia de transmissão da doença, salientando a importância da utilização de equipamentos de proteção individual (Figura 15) e respeito às proibições (Figura 16) (CDC, 1993; BURGOS-RODRIGUEZ, 2011; OIE, 2014). Além de abranger toda a força laboral das instituições, principalmente aquela que interage diretamente com os animais, voluntários, estagiários e estudantes também devem ser contemplados (FROST, 2006; SHIPLEY et al., 2008).

Assim, todos os indivíduos que lidam rotineiramente com esses animais devem ser

testados para tuberculose antes de contatá-los e retestados anualmente (CDC, 1993; IALEGGIO, 1997). Há autores que recomendam o teste tuberculínico intradérmico a cada seis meses ou até quatro vezes ao ano, dependendo da quantidade de primatas no local. Recomenda-se agregar outros exames para a confirmação do diagnóstico. Em caso suspeito, o indivíduo deve ser afastado do contato com os animais até que o diagnóstico definitivo o considere livre da infecção; caso contrário, deverá ser afastado do contato com animais até o fim do tratamento (BUSHMITZ et al., 2009; BURGOS-RODRIGUEZ, 2011).

Além disso, os técnicos que manipulam fluidos, fezes e tecidos merecem especial atenção e treinamento.

Como recomendação geral, a contenção física desses animais deve ser feita apenas por técnicos qualificados e experientes, e nunca por

uma única pessoa. Adicionalmente, é importante que os técnicos estejam treinados para evitar arranhões, mordidas ou outros ferimentos durante o manuseio (OIE, 2014).



Figura 15 - Equipamentos de proteção individual utilizados no manejo com primatas não humanos



Figura 16 - Placas de avisos para funcionários e visitantes

9 REFLEXÕES FINAIS

Apesar de todos os esforços das autoridades em saúde pública para diminuir os casos humanos de tuberculose, ela atualmente aparece no cenário mundial como uma das principais doenças reemergentes.

Animais silvestres mantidos em cativeiro, em particular os primatas, são altamente suscetíveis à tuberculose, ocorrendo alta morbidade e mortalidade em surtos, gerando grandes perdas econômicas e risco para os humanos em estreito contato com estes animais (MICHEL; HUCHZERMEYER, 1998; UNE; MORI, 2007; BUSHMITZ et al., 2009; WHO, 2011).

Em muitos países, existe legislação rígida e específica, direcionada ao combate da tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro. Embora haja limitações técnicas, principalmente em relação aos métodos de diagnóstico indireto, as experiências relatadas por

países da Europa e América do Norte permitem afirmar que é possível reduzir os riscos de introdução e disseminação da tuberculose nesses animais através da adoção de um conjunto de medidas que podem ser resumidas em: observação de garantias sanitárias quando da introdução de novos animais no plantel, implementação de sistema de vigilância para tuberculose e adoção de medidas de biossegurança (KANEENE; THOEN, 2004; FROST, 2006).

A aquisição de novos animais deve ser um processo seguro, evitando-se a introdução de agentes patogênicos nas coleções sadias. Várias medidas devem ser tomadas pelas instituições que irão receber o animal, como analisar e conhecer o fornecedor, que deve dispor de certificados e documentos que comprovem que os animais estão sadios, com todo o histórico médico demonstrando que foram colocados em quarentena e testados para tuberculose antes do embarque.

Ao chegarem à instituição de destino, devem ser colocados imediatamente em isolamento, em uma área específica de quarentena, seguindo rígido regime de avaliações, testes para tuberculose e condutas já descritos anteriormente (OIE, 2014). Nos Estados Unidos da América, os procedimentos de quarentena existem desde a década de 1940, quando houve um aumento na importação de primatas para a utilização em pesquisas científicas, sendo muitos deles retirados diretamente da natureza, o que aumentou o risco de transmissão de doenças até então desconhecidas. Após alguns anos, reconhecendo os riscos para a saúde pública relacionados à importação de primatas não humanos, o governo americano regulamentou essas medidas tornando-as obrigatórias em todo o país. A quarentena é aplicada tanto em animais que são importados, denominada quarentena primária ou internacional, quanto naqueles que são transferidos entre

instituições dentro do país, denominada quarentena secundária ou doméstica (ROBERTS; ANDREWS, 2008). No Brasil, muitas instituições mantenedoras de primatas não dispõem de instalações para quarentena (CUBAS, 2008).

O controle da tuberculose deve ser feito rotineiramente nos animais. Atualmente, o teste tuberculínico é o mais utilizado para ações de vigilância da doença em primatas, sendo aplicados a intervalos que variam de acordo com a espécie e a quantidade de animais no local. A detecção da doença deve ser feita o mais precocemente possível para reduzir as consequências do surto. Nos primatas, a detecção da forma latente e da forma ativa da tuberculose são igualmente importantes. Animais com a forma latente não são infecciosos e podem ficar sem sinais clínicos da doença por muito tempo. Todavia, uma eventual reativação pode resultar em transmissão secundária e determinar um surto dentro da

colônia. A reativação da infecção latente, que muitas vezes não é detectada através dos testes tradicionais de diagnóstico durante a quarentena, é um importante fenômeno no curso da tuberculose dos primatas em cativeiro (LERCHE et al., 2008).

Apesar de o teste tuberculínico ser o mais utilizado nos programas de prevenção e vigilância, tem suas limitações, dentre as quais se destacam as dificuldades para detecção de animais com infecção latente e anérgicos, sendo esta última condição geralmente resultado de imunossupressão. Em função disso, pesquisadores procuram desenvolver e melhorar a sensibilidade e a especificidade dos testes indiretos de diagnóstico. Resultados promissores são obtidos quando da utilização combinada de testes que se baseiam na detecção da resposta imunológica mediada por células com testes que se baseiam na detecção da resposta humoral (LERCHE et al., 2008; BUSHMITZ et al., 2009).

As instituições devem possuir uma estrutura adequada, que mitigue o risco de entrada e disseminação de patógenos. Os recintos devem ser construídos de maneira a evitar a contaminação dos alimentos e da água por fezes, para permitir a limpeza e desinfecção adequadas, e impedir o contato direto e indireto dos animais com o público visitante, através da utilização de barreiras de vidro ou de fossos. O contato dos animais com alimentos e objetos jogados nos recintos pelos visitantes podem conter patógenos, significando risco de exposição. A barreira de vidro, adotada nos Estados Unidos da América e em muitos países da Europa desde a década de 1930, resultou na diminuição da incidência da tuberculose em primatas (MONTALI et al., 2001). Os recintos devem reproduzir as características ambientais do local de origem dos animais e dispor de medidas e estruturas de enriquecimento. Deve-se, também, colocar o menor número

possível de animais por recinto (BUSHMITZ et al., 2009; OIE, 2014). Assim, é possível diminuir o estresse dos animais, diminuindo também a vulnerabilidade a infecções.

A formação de uma equipe estável e bem capacitada é essencial para a implementação dos programas de prevenção e sistema de vigilância para tuberculose nas instituições que mantêm primatas em cativeiro. No Brasil, é frequente a rotatividade de funcionários nos zoológicos públicos, prejudicando o andamento de programas sanitários (CUBAS, 2008).

O monitoramento da saúde dos funcionários, principalmente daqueles que possuem contato rotineiro com os animais, é importante no controle da disseminação da infecção dentro das instituições, pois a tuberculose é uma zoonose que pode ser transmitida tanto dos homens para os primatas quanto dos primatas para o homem. As instituições devem ter um programa

de monitoramento da saúde dos funcionários para garantir, conseqüentemente, a dos animais. Como já especificado no capítulo anterior, é recomendável a adoção de rotina de testes para tuberculose em todos os funcionários da instituição.

Diferentemente dos países da Europa e da América do Norte, no Brasil não existe legislação que especifique e regule os procedimentos que devem ser adotados após a aquisição de novos animais em zoológicos e outras instituições que mantêm animais silvestres em cativeiro. Isso prejudica a fiscalização desses locais pelos órgãos competentes, pois não há base legal para cobrar das instituições a observação de medidas de quarentena ou de sistema de vigilância.

Atualmente, as leis que citam a necessidade de quarentena são:

- a Lei nº 7.173, de 14 de dezembro de 1983, cita que a aquisição ou coleta de animais da

fauna silvestre brasileira para as instituições nacionais dependerá sempre de uma licença prévia do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF) (BRASIL, 1983), mas não cita a necessidade de colocar esses animais em quarentena. No artigo 12 dessa mesma lei, no caso de importação de animais da fauna não pertencente à brasileira, os zoológicos terão que atender as exigências de quarentena estabelecidas pelo IBDF (BRASIL, 1983). O IBDF foi extinto pela Lei nº 7.732, de 14 de fevereiro de 1989 e posteriormente suas funções foram transferidas para o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), de acordo com a Lei nº 7.735, de 22 de fevereiro de 1989 (BRASIL 1989). Consequentemente, quem fornece as licenças e estabelece as exigências da quarentena é o IBAMA, mas

atualmente não existe nenhuma lei que descreva e estabeleça essas exigências.

- a Instrução Normativa nº 04, de 4 de março de 2002, dispõe sobre uma série de requisitos para que as instituições consigam obter o registro como jardim zoológico público ou privado e uma delas é que estes locais possuam um setor destinado à quarentena (BRASIL, 2002), mas não especifica as condições estruturais do setor de quarentena, nem os procedimentos que devem ser realizados durante este período.

Tendo em vista essas falhas na legislação e sabendo da urgência em se regulamentar a questão para permitir as fiscalizações das instituições, a Sociedade Paulista de Zoológicos enviou ao IBAMA de São Paulo e ao IBAMA de Brasília uma sugestão de programa de quarentena a ser executado pelos zoológicos (SOCIEDADE

PAULISTA DE ZOOLÓGICOS, 2011), mas até o momento nenhuma medida foi tomada.

10 CONCLUSÕES

A natureza insidiosa da tuberculose e a performance apenas regular dos testes diagnósticos indiretos disponíveis constituem um desafio para aqueles que mantêm primatas não humanos em cativeiro (IALEGGIO, 1997; CAPUANO et al., 2003; FROST, 2006; LERCHE et al., 2008; LIN et al., 2008; McMANAMON, 2008; BUSHMITZ et al., 2009).

Apesar dessas limitações, desde meados do século XX, vários países da Europa e da América do Norte vêm aplicando estratégias que resultaram na mitigação do problema, envolvendo quarentena e sistemas de vigilância previstos em lei. O custo com a vigilância é mínimo se considerados os efeitos da doença nos animais, notadamente aqueles ameaçados de extinção (FROST, 2006).

No Brasil, as informações disponíveis sobre tuberculose em primatas não humanos cativos limitam-se a um pequeno número de relatos de casos, havendo enorme temor das

instituições que abrigam estes animais em notificar casos e enfrentar de maneira adequada o problema. Em boa medida, essa situação é fomentada pela inexistência de leis que obriguem essas instituições a cumprir regras sanitárias que diminuam a vulnerabilidade à tuberculose e outras doenças infecciosas.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSO, R.; ROMERO, R. E.; DIAZ, A.; CALDERON, M. N.; URDANETA, G.; ARCE, J.; PATARROYO, M. E.; PATARROYO, M. A. Isolation and identification of mycobacteria in New World primates maintained in captivity. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3-4, p. 285-295, 2004.
- AMORIM, B.A.; CASAGRANDE, R.A.; ALIEVI, M.M.; WOUTERS, F.; OLIVEIRA, L.G.S.; DRIEMEIER, D.; TAVARES, M.; IKUTA, C.Y.; TELLES, E.O.; FERREIRA NETO, J.S. *Mycobacterium pinnipedii* in a Stranded South American Sea Lion (*Otaria byronia*) in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 2, p. 419-422, 2014.
- ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; GALÁN, J. C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SÚAREZ, G.; DOMÍNGUEZ, 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, n. 3, p. 1263-1273, 1999.
- ASCENZI, J. M. Glutaraldehyde-based disinfectants. In: ASCENZI, J.M. (Ed.). **Handbook of disinfectats and antiseptics**. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1996. p. 11-32.

- BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 12, p. 1149-1156, 2003.
- BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. Nonhuman primates in biomedical research. In: American Colleges of Laboratory Animal Medicines Series. BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (Ed.). **Diseases**. San Diego, CA: Academic Press, 1998. p. 84-89.
- BEST, M.; SATTAR, S. A.; SPRINGTHORPE, V. S.; KENNEDY, M. E. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 2234-2239, 1990.
- BONE, J. F.; SOAVE, O. A. Experimental tuberculosis in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). **Laboratory Animal Care**, v. 20, n. 5, p. 946-948, 1970.
- BOSTOCK, S. S. C. Zoos and zoological parks. In: CHADWICK, R. (Ed.). **Encyclopedia of applied ethics**. San Diego: Academic Press, 1998.v. 4, p. 571-582.
- BRASIL. Decreto nº 3607, de 21 de setembro de 2000. Dispõe sobre a implementação da Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção-CITES, e da outras providências.

Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 22 set. 2000. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-fauna-silvestre/legislacao>>. Acesso em: 19/10/2011.

BRASIL. Instrução Normativa nº 04, de 04 de março de 2002. Dispõe sobre a obtenção do registro de jardins zoológicos públicos ou privados, consoante com o disposto no Art. 2º da lei nº 7173, de 14 de dezembro de 1983. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Diário Oficial** 46, Brasília, DF, 08 mar. 2002. Seção 01, p. 121-128. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-fauna-silvestre/legislacao>>. Acesso em: 19/10/2011.

BRASIL. Lei Federal nº 7735, de 22 de fevereiro de 1989. Dispõe sobre a extinção de órgão e de entidade autárquica, cria o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis e da outras providências. Ministério da Casa Civil. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 fev. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7735.htm>. Acesso em: 19/10/2011.

BRASIL. Lei Federal nº 7.173, de 14 de dezembro de 1983. Dispõe sobre o estabelecimento e funcionamento de jardins zoológicos e das outras providências. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 14 dez. 1983. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-fauna-silvestre/legislacao>>. Acesso em: 19/10/2011.

BRASIL. Portaria nº 117, de 15 de outubro de 1997. Dispõe sobre a comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna silvestre brasileira provenientes de criadouros com finalidade econômica e industrial e jardins zoológicos registrados junto ao IBAMA. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 out. 1997. Sec. 01, p. 23489-23490. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-fauna-silvestre/legislacao>>. Acesso em: 19/10/2011.

BRASIL. Portaria nº 93, de 07 de julho de 1998. Dispõe sobre a importação e exportação de espécimes vivos, produtos e subprodutos da fauna silvestre brasileira e da fauna silvestre exótica. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos

Hídricos e da Amazônia Legal/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 jul. 1998. Sec. 01, p. 74-77. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-fauna-silvestre/legislacao>>. Acesso em: 19/10/2011.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 83, n. 1-3, p. 91-97, 2003.

BROSCH, R.; GORDON, S.V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESES, 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 National Academy of Sciences of United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

BROSCH, R.; PYM, A. S.; GORDON, S. V.; COLE, S. T. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 452-458, 2001.

BROSMAN, S. A. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy: techniques and results. **Urologic**

- Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 557-564, 1992.
- BRUSASCA, P. N.; PETERS, R. L.; MOTZEL, S. L.; KLEIN, H. J.; GENNARO, M. L. Antigen recognition by serum antibodies in non-human primates experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Comparative Medicine**, v. 53, n. 2, p. 165-172, 2003.
- BURGOS-RODRIGUEZ, A. G. Zoonotic diseases of primates. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 14, n. 3, p. 557-575, 2011.
- BUSHMITZ, M.; LECU, A.; VERRECK, F.; PREUSSING, E.; RENSING, S.; MARTZ-RESING, K. Guidelines for the prevention and control of tuberculosis in non-human primates: recommendations of the European Primate Veterinary Association Working Group on Tuberculosis. **Journal of Medical Primatology**, v. 38, n. 1, p. 59-69, 2009.
- CALLE, P. P. Tuberculin responses in orangutans. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**. Pennsylvania: Saunders Co., 1999. p. 392-396.
- CAPUANO, S. V.; CROIX, D. A.; PAWAR, S.; ZINOVIK, A.; MYRES, A.; LIN, P. L.; BISSEL, S.; FUHRMAN, C.; KLEIN, E.; FLYNN, J. L. Experimental *Mycobacterium tuberculosis*

infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5831-5844, 2003.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Tuberculosis in imported nonhuman primates. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 42, n. 29, p. 572-576, 1993. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021299.htm>>. Acesso: 20 out. 2011.

CLIFTON-HADLEY, R. S.; SAUTER-LOUIS, C. M.; LUGTON, I. W.; JACKSON, R.; DURR, P. A.; WILESMITH, J. W. Mycobacterial diseases. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. **Infections diseases of wild mammals**. 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. Cap. 21, p. 340-357.

CORCORAN, K. D.; THOEN, C. O. Application of an enzyme immunoassay for detecting antibodies in sera of *Macaca fascicularis* naturally exposed to *Micobacterium tuberculosis*. **Journal of Medical Primatology**, v. 20, n. 8, p. 404-408, 1991.

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.; DOWSON, 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. 52, pt. 5, p. 1305–1314, 2003.
- CUBAS, Z. S. Biossegurança na manipulação de animais silvestres. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 174-177, 2008. Suplemento 1.
- DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Advances in Microbial Physiology**, v. 39, p. 131-203, 1998.
- DALOVISIO, J. R.; STETTER, M.; MIKOTA-WELLS, S. Rhinoceros' rhinorrhea: cause of an outbreak of infection due to airborne *Mycobacterium bovis* in zookeepers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 598–600, 1992.
- DUKELOW, W.R.; PIERCE, D.L. Identifying false positive TB reactions in New World Primates. **International Journal of Primatology**, v. 8, p. 556, 1987.

- FERREIRA NETO, J. S.; VALVASSOURA, T.; CATÃO-DIAS, J. L. Avanços no diagnóstico da tuberculose em animais selvagens. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - medicina veterinária**. São Paulo: Rocca, 2014. Cap. 68, p. 1382-1388.
- FLYNN, J. L. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1179-1188, 2006.
- FLYNN, J. L.; CAPUANO, S. V.; CROIX, D.; PAWAR, S.; MYERS, A.; ZINOVIK, A.; KLEIN, E. Non-human primates: a model for tuberculosis research. **Tuberculosis**, v. 83, n. 1-3, p. 116-118, 2003.
- FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 93-129, 2001.
- FRANCIS, J. Susceptibility to tuberculosis and the route of infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 9, p. 414, 1971.
- FROST, P. A. Tuberculosis in Nonhuman Primates with and Emphasis on *Mycobacterium bovis*. In: THOEN, C. O.; STEELE, F. H.; GILSDORF, M. F. ***Mycobacterium bovis* infection in animals and humans**. 2th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2006. cap.27, p. 271-284.

- FU, L. M.; FU-LIU, C. S. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? **Tuberculosis (Edinb)**, v. 82, n. 2-3, p. 85-90, 2002.
- GARCIA, M. A.; YEE, J.; BOULEY, D. M.; MOORHEAD, R.; LERCHE, N. W. Diagnosis of tuberculosis in macaques using whole blood in vitro interferon-gamma (Primagam) testing. **Comparative Medicine**, v. 54, n. 1, p. 86-92, 2004.
- GOOD, R. C. Diseases in nonhuman primates. In: KUBICA, G. P.; WAYNE, L. G. (Ed.). **The Mycobacteria: a sourcebook**. New York: Dekker, 1984. p. 903-924.
- GORMUS, B. J.; BLANCHARD, J. L.; ALVAREZ, X. H.; DIDIER, P. J. Evidence for a rhesus monkey model of asymptomatic tuberculosis. **Journal of Medical Primatology**, v. 33, p. 134-145, 2004.
- HARRIS, N. B. Molecular Techniques: Application in Epidemiologic Studies. In: THOEN, C. O.; STEELE, F. H.; GILSDORF, M. F. ***Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans**. 2 ed. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2006. Cap.7, p. 54-62.
- HEDIGER, H. **Wild animals in captivity**. New York: Dover Publications Inc., 1964.

- HINES, M. E.; KREEGER, J.; HERRON, A. J.
Mycobacterial infections of animals pathology
and pathogenesis. **Laboratory Animal Science**,
v. 45, n. 4, p. 334-351, 1995.
- HOCHADEL, O. Science in the 19th-century zoo.
Endeavour, v. 29, n. 1, p. 38-42, 2005.
- HOLTON, J.; SHETTY, N.; MCDONALD, V.
Efficacy of “Nu-Cidex” (0,35% peracetic acid)
against mycobacteria cryptosporidia. **Journal of
hospital infection**, v. 31, n. 3, p. 235-237, 1995.
- IALEGGIO, D. M. Mycobacterial disease in the
nonhuman primate. **Seminars in Avian and
Exotic Pet Medicine**, v. 6, n. 1, p. 34-39, 1997.
- ISAZA, R. Tuberculosis in all taxa. In: FLOWLER,
M. E.; MILLER, R. E. (Ed.). **Zoo and wild
animal medicine**. 5 ed. Pennsylvania: W.B.
Saunders Company, 2003. p. 689–696.
- JOHNSON-DELANEY, C. A. Primates. **Veterinary
Clinics of North America: Small Animal
Practice**, v. 24, n. 1, p. 121-156, 1994.
- KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; VAN
AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.;
KUIJPER, A.; BUNSCHOTEN, A.;
MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.;
VAN EMBDEN, J. D. A. Simultaneous detection
and strain differentiation of *Mycobacterium
tuberculosis* for diagnosis and epidemiology.

- Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 04, p. 907-914, 1997.
- KANAUJIA, G. V.; BOULEY, D. M.; PETERS, R.; GENNARO, M. L. Detection of early secretory antigenic target-6 antibody for diagnosis of tuberculosis in non-human primates. **Comparative Medicine**, v. 53, n. 6, p.602–606, 2003.
- KANEENE, J. B.; THOEN, C. O. Tuberculosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 5, p. 685-691, 2004.
- KEET, D. F.; KRIEK, P. J.; BENGIS, R. G.; GROBLER, D. G.; MICHEL, A. The rise and fall of tuberculosis in a free-ranging chacma baboon troop in the Kruger National Park. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 67, p. 115-122, 2000.
- KING, N. W. Tuberculosis. In: JONES, T. C.; MOHR, U.; HUBT, R. D. **Monographs on pathology of laboratory animals non-human primates**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. v. 1, p. 141-148.
- LAGE, A.P.; ROXO, E.; MÜLLER, E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J.C.M.; FERREIRA NETO, J.S.; MOTA, P.M.P.C.; GONÇALVES, V.S.P. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Manual Técnico**. Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2006, 184p.

LEATHERS, C. W.; HAMM JR, T. E. Naturally occurring tuberculosis in a squirrel monkey and a cebus monkey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n. 9, p. 909–911, 1976.

LERCHE, N. W. Detecting tuberculosis in nonhuman primates: potential adjuncts and alternatives to tuberculin skin testing. In: Meeting on Tuberculosis Testing in Nonhuman Primates, 2007, Atlanta: **Centers for Disease Control Public**, 2007.

LERCHE, N. W.; YEE, J. L.; CAPUANO, S. V.; FLYNN, J. New approaches to tuberculosis surveillance in nonhuman primates. **ILAR Journal**, v. 49, n. 2, p. 170-178, 2008.

LEWINSOHN, D. A. High resolution radiographic and fine immunologic definition of TB disease progression in the rhesus macaque. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2587–2598, 2006.

LEWINSOHN, D. M.; TYDEMAN, I. S.; FRIEDER, M.; GROTZKE, J. E.; LINES, R. A.; AHMED, S.; PRONGAY, K. D.; PRIMACK, S. L.; COLGIN, L. M. A.; LEWIS, A. D.; LIN, L. P.; YEE, J.; KLEIN, E.; LERCHE, N. W. Immunological concepts in tuberculosis diagnostic for non-human primates: a review. **Journal of**

- Medical Primatology**, v. 37, p. 44-51, 2008. Supplement 1.
- LISLE, G. W.; BENGIS, R. G.; SCHMITT, S. M.; O'BRIEN, D. J. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. **Revue Scientifique et Technique / Office International des Épizooties**, v. 21, n. 2, p. 317–334, 2002.
- LYASHCHENKO, K. P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; GREENWALD, D.; NACY, C. A.; GIBSON, S.; DIDIER, P. J.; WASHINGTON, M.; SZCZERBA, P.; MOTZEL, S.; HANDT, L.; POLLOCK, J. M.; MCNAIR, J.; ANDERSEN, P.; LANGERMANS, J. A. M.; VERRECK, F.; ERVIN, S.; ERVIN, F.; MCCOMBS, C. PRimaTB STAT-PAK assay, a novel rapid lateral flow test for tuberculosis in nonhuman primates. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1158–1164, 2007.
- MALAGA, C. A.; WELLER, R. E.; BRODERSON, J. R.; GOZALO, A. S. Tuberculosis-like lesions arising from the use of Freund's complete adjuvant in an owl monkey (*Aotus* sp.). **Journal of Medical Primatology**, v. 33, p. 109–12, 2004.
- MANNING, E.J.B.; COLLINS, M.T. Mycobacterial infections in domestic and wild animals. **Scientific and Technical Review/ World**

- Organization for Animal Health. Paris, v.20, n.1, p. 350, 2001.
- MCMANAMON, R. Diagnostic testing in nonhuman primates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 17, n. 1, p. 31-38, 2008.
- MCMURRAY, D. N.; BARTOW, R. A. Immunosuppression and alteration of resistance to pulmonary tuberculosis in guinea pigs by protein undernutrition. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3, p. 738-743, 1992.
- MICHEL, A. L.; BEGINS, 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.
- MICHEL, A. L.; HUCHZERMEYER, H. F. The zoonotic importance of *Mycobacterium tuberculosis* transmission from human to monkey. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 69, n. 2, p. 64-65, 1998.
- MILLER, M. A. Current diagnostic methods for tuberculosis in zoo animals. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**. 6. ed. St Louis: Saunders, 2008. cap. 2, p. 10-19.

- MINER, N.; MCDOWEL, J. W.; WILLCOCKSON, G. W.; BUCKNER, N. I.; STARK, R. L.; WHITMORE, E. J. Antimicrobial and other properties of a new stabilized alkaline glutaraldehyde disinfectant sterilizer. **American Journal of Hospital Pharmacology**, v. 34, n. 4, p. 376-382, 1977.
- MONTALI, R. J.; MIKOTA, S. K.; CHENG, L. I. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. **Revue Scientifique et technique/ Office International des Épizooties**, v. 20, n. 1, p. 291-303, 2001.
- MORELAND, A. F. Tuberculosis in New World primates. **Laboratory Animal Care**, v. 20, n. 2, p. 262-264, 1970.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Mycobacterium*. In: **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 275-288.
- O'BRIEN, D. J.; STEPHEN, M. S.; BRENT, A. R.; GRAHAM, N. Recent advances in the management of bovine tuberculosis in free-ranging wildlife. **Veterinary Microbiology**, v. 151, n. 1-2, p. 23-33, 2011,
- O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, p. 1-46, 1995. Supplement 1.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WHO). **Terrestrial Animal Health Code**. Paris: OIE, 2014. Disponível em <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>>. Acesso: 13 out. 2014.

OTT J. E. Tuberculin testing in primates. In: Annual Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, 1979, Denver, Colorado. **Proceedings**...Denver, Colorado, 1979. p. 75-80.

PALMER, M. V. Tuberculosis: A reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 315, p. 195–215, 2007.

PARSONS, S. D. C.; GOUS, T. A.; WARREN, R. M.; VILLIERS, C.; SEIER, J. V.; VAN HELDEN, P. D. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in chacma baboons (*Papio ursinus*) using the QuantiFERON-TB Gold (In tube) assay. **Journal of Medical Primatology**, v. 38, n. 6, p. 411-417, 2009.

POTKAY, S.; GANAWAY, J. R.; ROGERS, N. G.; KINARD, R. An epizootic of measles in a colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 27, n. 116, p. 331–333, 1966.

- PRINDLE, R. F. Phenolic compounds. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. p. 197-224.
- RENQUIST, D. M.; POTKAY, S. *Mycobacterium scrofulaceum* infection in *Erythrocebus patas* monkeys. **Laboratory Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 97-101, 1979.
- RENQUIST, D. M.; WHITNEY, R. A. Tuberculosis in nonhuman primates-An overview. In: MONTALI, R. J. (Ed.). **Mycobacterial infections of zoo animals**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1978. p. 9-16.
- ROBERTS, J. A.; ANDREWS, K. Nonhuman primate quarantine: its evolution and practice. **ILAR Journal**, v. 49, n. 2, p. 145-156, 2008.
- ROCHA, V.C.M.; CORRÊA, S. H. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUES, C. A. R.; FEDULLO, J.D.; MATRONE, M. S.; SETZER, A.; IKUTA, C. Y.; VEJARANO, M. P.; FIGUEIREDO, S. M.; FERREIRA NETO, J. S. Tuberculosis determined by *Mycobacterium bovis* in captive Waterbucks (*Kobus ellipsiprymnus*) in São Paulo, Brazil. Brazilian. **Journal of Microbiology** (Impresso), v. 42, p. 726-728, 2011b.
- ROCHA, V. C.; DE FIGUEIREDO, S. C.; ROSALES, C. A.; DE HILDEBRAND E GRISI FILHO, J. H.; SOARES, R. M.; FERREIRA

- NETO, J. S. Molecular Discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, p. 17-21, 2013b.
- ROCHA, V. C. M.; FERREIRA NETO, J. S. Análise de regiões *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*: tipagem de *Mycobacterium bovis* por spoligotipagem. In: CUNHA, M. V.; INÁCIO, J. **Abordagens Moleculares em Veterinária - como desvendar a etiologia e a epidemiologia da infecção**. Lidel (Lisboa, Portugal), p. 313-317, 2014.
- ROCHA, V. C. M.; IKUTA, C. Y.; CORRÊA, S.H.R.; SETZER, A. P.; CATÃO DIAS, J. L.; RAMOS, M. C. C.; FIORI, W.; FERREIRA NETO, J. S. *Mycobacterium kansasii* isolation from captive South American coati (*Nasua nasua*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, p. 167-168, 2013a.
- ROCHA, V.C.M.; IKUTA, C.Y.; GOMES, M.S.; QUAGLIA, F.; MATUSHIMA, E.R.; FERREIRA NETO, J.S. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from captive *Ateles paniscus*. **Vector- Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 5, p. 593-594, 2011a.
- RUBIN, J. Agents for disinfection and control of tuberculosis. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. 3.

- ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. p. 414-421.
- RUSSELL, A. D. Activity of biocides against mycobacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 81, p. 87-101, 1996.
- RUSSELL, A. D. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE, G. A. J. (Ed.). **Principies and practice of disinfection, preservation and sterilization**. London: Blakwell, 1982. p. 107-133.
- RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfection and sterilization in health care facilities: what clinicians need to know. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 702-709, 2004.
- SAPOLSKY, R. M.; ELSE, J. G. Bovine tuberculosis in a wild baboon population: Epidemiologic aspects. **Journal of Medical Primatology**, v. 16, n. 4, p. 229-235, 1987.
- SHIPLEY, S. T.; COKSAYGAN, T.; DAVID, K. J.; MCLEORD, C. G.; DE TOLLA, L. J. Diagnosis and prevention of dissemination of tuberculosis in a recently imported rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, v. 37, p. 20-24, 2008. Supplement 1.
- SILVA, J. C. R.; FELIPPE, P. A. N. Biossegurança. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens –**

- medicina veterinária.** São Paulo: Roca, 2014. Cap. 113, p. 2152-2177.
- SOAVE, O.; JACKSON, S.; GHUMMAN, J. S. Atypical mycobacteria as the probable cause of positive tuberculin reactions in squirrel monkeys. **Laboratory Animal Science**, v. 31, n. 3, p.295–296, 1981.
- SOCIEDADE PAULISTA DE ZOOLÓGICOS. Programa de Quarentena. São Paulo: SPZOO, 2011. Disponível em: <<http://www.spzoo.org.br/quarentena.htm>>. Acesso: 20 maio 2011.
- SPAULDING, E. H.; CUNDY, K. R.; TURNER, F. J. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1997. p. 654-684.
- STALEY, E. C.; SOUTHERS, J. L.; THOEN, C. O.; EASLEY, S. P. Evaluation of tuberculin testing and measles prophylaxis procedures used in rhesus macaque quarantine/conditioning protocols. **Laboratory Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 125–130, 1995.
- STANLEY, K. A. B. Los zoológicos en México: una visión del pasado y sus tareas actuales. In: ARROYO, J.; CORONA, E. (Ed.). **Relaciones hombre-fauna: una zona interdisciplinaria de estudio**. México, Conaculta/ Instituto Nacional de

Antropologia e Historia: Plaza y Valdes, 2002. p. 51-62. Disponível em: <<http://books.google.com/books?hl=ptBR&lr=&id=W0WRXqBaxEcC&oi=fnd&pg=PA51&dq=historia+dos+zoologicos+&ots=mVMfmh1o3G&sig=UBLVR13YbQH3AkeZkuHV-zWcVw#v=onepage&q&f=false>>. Acesso: 04/02/2011.

SUPPLY, P.; MAGDALENA, J.; HIPENS, S.; LOCHT, C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 991-1003, 1997.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

TAMBE, Y. **Schematic diagram of Mycobacterial cell wall**. 2006. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mycobacterial_cell_wall_diagram.png>. Acesso: 30 jun. 2014.

THOEN, C. O.; CHIODINI, R. *Mycobacterium*. In: GYLES, C. L.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. Cap. 4, p. 44-56.

- THOREL, M. F.; KAROUI, C.; VARNEROT, A.; FELURY, C.; VINCENT, V. Isolation of *Mycobacterium bovis* from baboons, leopards and sea-lion. **Veterinary Research**, v. 29, n. 2, p. 207-212, 1998.
- TIRUVILUAMALA, P.; REICHMAN, L. B. Tuberculosis. **Annual Review of Public Health**, v. 23, p. 403–426, 2002.
- TOOSSI, Z.; ELLNER, J. J. Pathogenesis of tuberculosis. In: FRIEDMAN, L. N. (Ed.). **Tuberculosis: current concepts and treatment**. 2. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2000. p. 19-47.
- UNE, Y.; MORI, T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 5-6, p. 415–425, 2007.
- UNIVERSITY OF CINCINNATI. **Tuberculin skin test**. Cincinnati, 2011. Disponível em: <http://ehs.uc.edu/lams/data/primates/9014/14_058.html>. Acesso: 20 set. 2011.
- VAN EMBDEN, J. D.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; MCADAM, R.; SHINNICK, T. M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a

- standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.
- VERVENNE, R. A. W.; JONES, S. L.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN DE R LAAN, T.; ANDERSEN, P.; HEIDT, P. J.; THOMAS, A. W.; LANGERMANS, J. A. M. TB diagnosis in non-human primates: comparison of two interferon-gamma assays and the skin test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, p. 61-71, 2004.
- WALSH, G. P.; TAN, E. V.; CRUZ, E. C.; ABALOS, R. M.; VILLAHERMOSA, L. G.; YOUNG, L. J.; CELLONA, R. V.; NAZARENO, J. B.; HORWITZ, M. A. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. **Nature Medicine**, v. 2, n. 4, p. 430-436, 1996.
- WARD, G. S.; ELWELL, M. R.; TINGPALAPONG, M.; POMSDHIT, J. Use of streptomycin and isoniazid during a tuberculosis epizootic in a rhesus and cynomolgus breeding colony. **Laboratory Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 395-399, 1985.
- WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M. C.;

- CHEGE, G. K.; VICTOR, T. C.; HOAL, E. G.; VAN HELDEN, P. D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.
- WILSON, P.; WEAVERS, B.; WEST, M.; TAYLOR, M.; KAVANAGH, J.; JONE, P. *Mycobacterium bovis* infection in primates in Dublin Zoo:epidemiological aspects and implications for Management. **Laboratory Animals**, v. 18, p. 383-387, 1984.
- WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 1, n. 4, p. 269-273, 1992.
- WOLF, R. H.; GIBSON, S. V.; WATSON, E. A.; BASKIN, G. B. Multidrug chemotherapy of tuberculosis in rhesus monkeys. **Laboratory Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 25-33, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control: WHO Report 2010**. Geneva, 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf>. Acesso: 15 fev. 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control: WHO Report 2011**.

Geneva, 2011. Disponível em:
<http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf>. Acesso: 13 out. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases. Geneva: WHO, 1984. 49 p. (WHO/VPH/84. 4).