

Tuberculose bovina em cervídeos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
46**

Tuberculose bovina em cervídeos

*Daiane Aparecida Rosa Lima
Rudielle de Arruda Rodrigues
Rodrigo Nestor Etges
Flávio Ribeiro de Araújo*

**Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2020**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368 2000
Fax: (67) 3368 2150
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Gado de Corte

Presidente
Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes

Secretário-Executivo
Rodrigo Carvalho Alva

Membros
Alexandre Romeiro de Araújo, Davi José
Bungenstab, Fabiane Siqueira, Gilberto
Romeiro de Oliveira Menezes, Marcelo Castro
Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Marta
Pereira da Silva, Mateus Figueiredo Santos,
Vanessa Felipe de Souza

Supervisão editorial
Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto
Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações
Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa

1ª edição
Publicação digitalizada (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Tuberculose bovina em cervídeos / Daiane Aparecida Rosa Lima ... [et al.]. –
Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2020.
PDF (18 p.). – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de
Corte,
ISSN 1983-9715 ; 46).

1. Mycobacterium bovis. 2. PCR. 3. Tuberculose. 4. Zoonose. 5. Veado.
I. Lima Daiane Aparecida Rosa. II. Rodrigues, Rudielle de Arruda. III. Etges,
Rodrigo Nestor. IV. Araújo, Flávio Ribeiro de. V. Série.

Sumário

Introdução.....	8
Material e métodos	9
Obtenção das amostras	9
Isolamento de <i>Mycobacterium bovis</i>	10
Extração de DNA para identificação de <i>Mycobacterium bovis</i> ..	10
Identificação por PCR.....	11
Resultados e discussão.....	11
Conclusão.....	16
Referências	16

Tuberculose bovina em cervídeos

Daiane Aparecida Rosa Lima¹

Rudielle de Arruda Rodrigues²

Rodrigo Nestor Etges³

Flávio Ribeiro de Araújo⁴

Resumo – A tuberculose bovina (bTB) é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por *Mycobacterium bovis*, que acomete animais domésticos, silvestres e o homem. Em animais silvestres mantidos em cativeiro, a bTB representa risco aos tratadores de animais e aos visitantes de zoológicos, e há também a possibilidade de disseminação da infecção para animais domésticos e pela venda de animais silvestres infectados. Cervídeos das espécies sambar (*Cervus unicolor*), nobre (*Cervus elaphus*) e dama (*Dama dama*) de um parque safári, do Rio Grande do Sul, apresentaram quadro clínico de bTB (dispneia e perda de peso). Alguns animais foram a óbito, sendo detectadas lesões sugestivas de tuberculose (LST), confirmadas por histopatológica. Com o impedimento de comercialização de animais, realizou-se eutanásia de 281 cervídeos com autorização do IBAMA. Foram coletados linfonodos retrofaríngeos, submandibulares e vísceras de 21 animais, que foram cultivados em meio Stonebrink por até 90 dias. Após extração de DNA das colônias, realizou-se PCR para alvos flanqueando a região de diferenciação 4 (RD4). Das 21 amostras, 14 (61,9%) apresentaram LST, com aspecto granulomatoso, coloração esbranquiçada, e consistência caseosa ou calcificada e sete (38,1%), não apresentaram lesões. No cultivo das 14 amostras com LST, 13 (92,8%) apresentaram crescimento bacteriano compatível com *M. bovis*. No cultivo das sete amostras sem LST, seis (92,8%) apresentaram colônias compatíveis com *M. bovis*. A PCR convencional detectou como positivos 19 culti-

¹ Médica-veterinária, mestranda em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

² Médica-veterinária, doutoranda em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

³ Médico-veterinário, mestre em Ciências Veterinárias. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Médico-veterinário, doutor em Imunologia. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

vos bacteriológicos sugestivos de *M. bovis*, confirmando o surto de bTB nos cervídeos. Lesões também foram detectadas em seis lhamas, um camelo, uma anta e um antílope, as quais foram confirmadas por histopatologia. Este fato sugere que houve transmissão entre espécies, muito embora não tenha sido possível realizar isolamento nestes casos. Estudos de genotipagem por sequenciamento genômico total estão sendo realizados com os isolados de *M. bovis* dos cervídeos, o que permitirá comparações filogenéticas com outros isolados já sequenciados no estado.

Termos para indexação: *Mycobacterium bovis*, zoonose, PCR, cervídeos.

Abstract – *Bovine Tuberculosis is an infectious disease caused by Mycobacterium bovis, affecting domestic animals, wild animals and humans. In captive wild animals, bTB poses a risk to animal keepers and zoo visitors, and there is also the possibility of spreading the infection to domesticated animals and selling infected wild animals. Sambar (Cervus unicolor), noble (Cervus elaphus) and lady (Dama dama) deer from a safari park in Rio Grande do Sul presented bTB (dyspnea and weight loss). Some animals died, and had lesions suggestive of tuberculosis (LST), confirmed by histopathology. With the impediment of commercialization of animals, 281 deer were euthanized with IBAMA authorization. Retropharyngeal and submandibular lymph nodes and viscera were collected from 21 animals, which were grown in Stonebrink medium for up to 90 days. After DNA extraction from the colonies, PCR was performed for targets flanking the region of differentiation 4 (RD4). Of the 21 samples, 14 (61.9%) presented LST with granulomatous appearance, whitish coloration, and caseous or calcified consistency, and seven (38.1%), showed no lesions. In the cultivation of 14 samples with LST, 13 (92.8%) presented bacterial growth compatible with M. bovis. In the cultivation of the seven samples without LST, six (92.8%) presented colonies compatible with M. bovis. Conventional PCR detected as positive 19 bacteriological cultures suggestive of M. bovis, confirming the outbreak of bTB in deer. Lesions were also detected in six llamas, a camel, a tapir and an antelope, which were confirmed by histopathology. This fact suggests that there was transmission between species, although it was not possible to perform isolation in these*

cases. Genotyping studies by total genomic sequencing are being performed with M. bovis isolates of deer, which will allow phylogenetic comparisons with other isolates already sequenced in the state.

Index terms: *Mycobacterium bovis*, zoonosis, PCR, deer.

Introdução

A tuberculose bovina (bTB) é uma doença crônica e debilitante, causada por *Mycobacterium bovis*, bactéria pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (MOL et al., 2016). O principal hospedeiro de *M. bovis* é o bovino, mas também afeta uma grande variedade de outras espécies domésticas e selvagens, incluindo humanos (KOHL et al., 2018).

A ocorrência de infecção por *Mycobacterium* sp. em animais silvestres mantidos em cativeiro têm sido extensivamente descrita. Em um Jardim Zoológico de Audubon, Nova Orleans, ocorreu um surto de tuberculose por *M. bovis*, que ocasionou na morte de quatro rinocerontes brancos (*Ceratotherium simum*) e dois macacos colobus brancos (*Colobus guereza caudatus*). Um surto de bTB resultou na infecção de um lêmure de Mayotte (*Lemur mayottensis mayottensis*), um macaco-macaco (*Macacus silenus*), um macaco patas (*Erythrocebus patas*) e um siamang (*Symphalangus syndactylus*) no zoológico de Dublin (ROCHA et al., 2011).

No Brasil, no Zoo Safari, que faz parte da instalação pertencente à Fundação Zoológico de São Paulo (SPZF), São Paulo, um par de pivas (*Kobus ellipsiprymnus*) apresentou sintomatologia de bTB, sendo o diagnóstico confirmado por necropsia (ROCHA et al., 2011).

Espécies como uapiti (*Cervus canadensis*), veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), cervo-sika (*Cervus nippon*), caribu (*Rangifer tarandus*), cervo-orelhudo (*Odocoileus hemionus*), cervo-dama (*Dama-dama*) e alce (*Alces alces*) são naturalmente acometidos por *M. bovis*, fato que prejudica os programas de erradicação da bTB em países desenvolvidos (RIBEIRO et al., 2017).

Por seu caráter zoonótico, a infecção por *M. bovis* em animais silvestres mantidos em cativeiro representa risco aos tratadores de animais e aos visitantes de parques e zoológicos, o que demonstra a indispensabilidade de um diagnóstico rápido e preciso em espécies silvestres (RIBEIRO et al., 2017).

Em fazendas de criação de animais silvestres, além dos riscos já citados, há também a possibilidade de disseminação da infecção para animais domésticos em propriedades circunvizinhas e a disseminação de focos, pela venda de animais silvestres infectados (ZIMPEL et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017).

A sintomatologia da bTB dificilmente é notável antes da morte em animais de zoológicos, uma vez que a maioria dos animais infectados são assintomáticos até a fase aguda da infecção. No entanto, alguns sinais clínicos podem ser notados, como: fraqueza, perda de peso crônica, dispneia, tosse e linfonomegalia (RIBEIRO et al., 2017).

Os sinais de tosse e dispneia geralmente indicam o curso final e irreversível da forma pulmonar da bTB. Já a perda de peso crônica é o sinal mais observado entre mamíferos selvagens (RIBEIRO et al., 2017).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é apresentar um surto de tuberculose bovina em cervídeos criados em cativeiro em um parque tipo safári no Estado do Rio Grande do Sul e descrever a utilização da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) como diagnóstico definitivo.

Material e métodos

Obtenção das amostras

O estudo foi realizado com 21 amostras de tecidos de cervídeos, das espécies sambar (*Cervus unicolor*), nobre (*Cervus elaphus*) e dama (*Dama dama*), provenientes de um parque do tipo safári, localizado no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Neste parque, houve notificação prévia de tuberculose bovina e bubalina em oito animais, eliminados conforme o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Houve também detecção, por meio de PCR, de *Mycobacterium* em cervídeos, que foram eutanasiados e necropsiados e identificadas lesões caseosas e calcificadas, sugestivas de bTB (LST).

Como o PNCEBT não descreve a metodologia da prova de intradermorreação para cervídeos, utilizou-se o procedimento adotado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Este procedimento foi realizado em 55 cervídeos, após tricotomia total do pescoço, e injeção de PPD (proteína purificada derivada) de *M. bovis* por via intradérmica (0,1 ml), conforme recomenda-se a técnica (USDA, 2005), sendo detectados 16 (29,1%) animais reagentes.

A Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul expediu notificação de impedimento de venda de cervídeos

positivos ao teste intradérmico para outros parques, quando então os proprietários decidiram pela eutanásia do plantel, o que foi autorizado pelo IBAMA. Ao todo, 281 cervídeos foram encaminhados ao abate sanitário em estabelecimento com serviço de inspeção oficial.

Durante o abate, foram coletados linfonodos retrofaríngeos, submandibulares e vísceras, com ou sem lesões sugestivas de tuberculose, aleatoriamente de 21 animais. As amostras de tecidos foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos vedados. Em seguida, foram imediatamente acondicionados em frascos tampa de rosca, e as amostras foram congeladas para posterior remessa, sob refrigeração, em caixa isolante térmica, que foi inserida em caixa de papelão, indicando tratar-se de material infectante, cumprindo as normas determinadas pela Instrução de Embalagem P/650-IATA (International Air Transport Association). As amostras foram então encaminhadas para o laboratório de Imunologia Animal da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS, para confirmação por cultivo e PCR.

Isolamento de *Mycobacterium bovis*

As amostras de tecidos foram mantidas congeladas a -30°C até serem processadas. Os fragmentos de tecidos perimetrais (entre 10 e 25 mg) foram macerados com 1,5 ml de água destilada estéril em aparelho Magna Lyser (*Roche Life Science*), usando esferas de cerâmica (*MagNA Lyser Green Beads*), por 30 segundos, a 6.000 rpm, por três vezes.

A fase aquosa resultante da maceração foi submetida à descontaminação por método de Petroff (Makovcova et al., 2015) e cultivada em meio de cultivo *Stonebrink*, incubadas a 37°C e avaliadas semanalmente por até 90 dias.

Extração de DNA para identificação de *Mycobacterium bovis*

Após o crescimento das colônias sugestivas de *M. bovis*, realizou-se a coleta das mesmas com alça de inoculação, ressuspendendo a massa bacteriana em tubo eppendorf contendo 200 μL de tris-EDTA, seguido de inativação por aquecimento em termobloco a 85°C por 30 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 13147.68 g-force por dois minutos. O precipitado formado foi

descartado e o sobrenadante com o DNA micobacteriano foi transferido para novos tubos e armazenado a -20°C para análise posterior.

Identificação por PCR

Os DNAs extraídos das colônias foram submetidos à PCR convencional Mb.400 segundo o protocolo de Sales et al. (2014), que consiste na amplificação de um fragmento de DNA de 400 pares de bases (pb) e que flanqueia a região de diferenciação 4 (Region of Difference 4 - RD4), específica de *M. bovis*. Os iniciadores utilizados foram: Mb. 400.F (5' AACGCGACGACCTCATATTC3') e Mb. 400.R (5' AAGGCGAACAGATTTCAGCAT3').

A PCR convencional foi realizada em termociclador MJ mini/personal thermal cycler (Bio-rad). As reações foram realizadas em um volume final de 25 μL , contendo 2,5 μL de tampão 10x PCR (MgCl_2); 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,5 μL de cada iniciador (20 pmol); 0,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 0,5 μL de dNTP mix [(10 mM de desoxinucleosídeo trifosfato (Invitrogen)); 3 μL de DNA. A amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C (30 seg), anelamento a 56°C (30 seg) e extensão a 72°C (30 seg), com um passo de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos amplificados da PCR foram corados com Gel Red e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X e observados em fotodocumentador (Bio-Rad), perante a luz ultravioleta.

Resultados e discussão

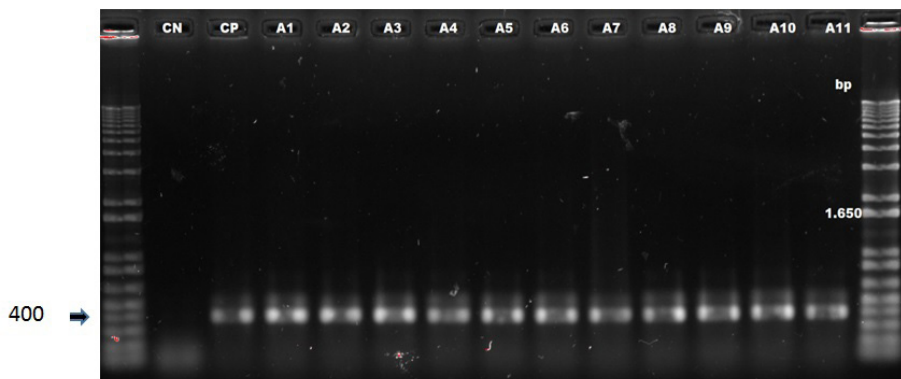
Das 21 amostras teciduais de cervídeos analisadas, 14 (61,9%) apresentaram LST, com aspecto granulomatoso, coloração esbranquiçada, e consistência caseosa ou calcificada (Figura 1), enquanto sete (38,1%) não apresentaram lesões.

No cultivo das 14 amostras que apresentaram LST em meio *Stonebrink*, 13 (92,8%) apresentaram crescimento bacteriano com morfologia compatível com *M. bovis*, ou seja, colônias arredondadas, pequenas, coloração creme-amareladas e com bordas irregulares. No cultivo das sete amostras sem LST, seis (92,8%) apresentaram colônias compatíveis com *M. bovis*.



Figura 1. Lesão sugestiva de tuberculose bovina em linfonodo de cervídeo.

A PCR convencional detectou como positivos 19 cultivos bacteriológicos sugestivos de *M. bovis*, confirmando o surto de bTB nos cervídeos (Figura 2). Os dados obtidos neste estudo demonstraram que a técnica de PCR foi eficaz para a detecção de *M. bovis*, tendo como resultado a amplificação de um fragmento de 400 (pb) que flanqueiam a região de diferenciação 4 (RD4), ausente em *M. bovis*, mas existente nos demais membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.



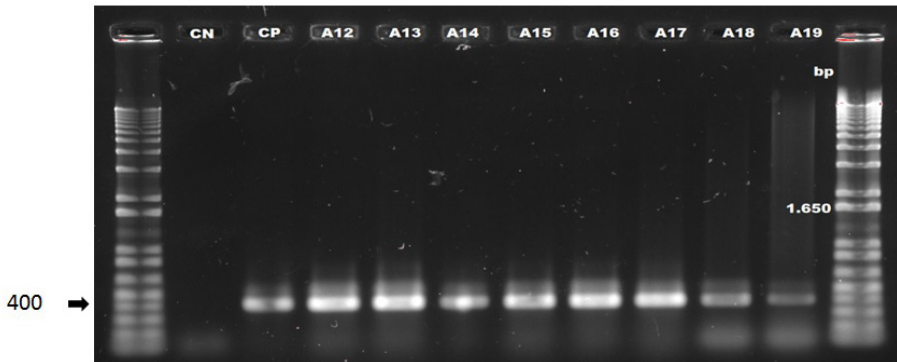


Figura 2. Amplificação de fragmento franqueando a região de diferenciação 4 de *M. bovis* por PCR (CN: controle negativo, CP: controle positivo, A: amostra), em amostras clínicas de cervídeos de zoológico do Rio Grande do Sul. Marcador molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

O controle da bTB em cervídeos tem sido árduo devido à indisponibilidade de diagnóstico eficiente, por conta da especificidade e sensibilidade de variáveis ao teste de intradermorreação, e incluindo também a dificuldade em distinguir infecções por *M. bovis* daquelas causadas por *M. avium* e outras micobactérias (RIBEIRO et al., 2017; ZIMPEL et al., 2017).

O diagnóstico clínico se mostra limitado devido à ocorrência tardia e inespecificidade dos sinais. Desta forma, o diagnóstico em cervídeos se baseia nas provas de intradermorreação, embora não estejam devidamente padronizadas para os mesmos (RIBEIRO et al., 2017).

Miller (2008) sugere a necropsia com coleta de todos os órgãos, preferencialmente os linfonodos, de todos os cervídeos com morte natural ou que foram submetidos à eutanásia. Assim, muitas vezes o diagnóstico é baseado na identificação das lesões.

Segundo Delahay et al. (2007), a presença de lesões isoladas não são indicadores confirmatórios de infecção por *M. bovis* em animais silvestres. Na Alemanha, padronizou-se o um protocolo baseado em teste cutâneo com PPD (*ante mortem*), o ensaio de liberação de interferon-gama (*ante mortem*), a cultura bacteriológica (*post mortem*) e um exame altamente específico, baseado em PCR em tempo real para a detecção de DNA de CMT em tecidos de animais (*post mortem*).

A cultura bacteriana é considerada padrão-ouro para estabelecer o diagnóstico de tuberculose, podendo ser realizada pela inoculação de *M. bovis* em meios de cultura sólidos, sendo Stonebrink, o principal meio utilizado para isolamento de *M. bovis*, devido à dificuldade desta espécie em crescer em meios glicerinados, desenvolvendo-se naquele meio contendo piruvato de sódio (OIE, 2019).

Apesar do diagnóstico definitivo da tuberculose ser baseado no isolamento e identificação, esta técnica apresenta algumas dificuldades, como a baixa sensibilidade, necessitando de quantidade considerável de bacilos viáveis e um tempo prolongado para o seu crescimento (até 90 dias). Essas condições nem sempre são atendidas, devido aos métodos de descontaminação, que além de eliminar os contaminantes podem também comprometer alguns bacilos para o isolamento (RUGGIERO et al., 2007). Além disso, a classificação definitiva da espécie de micobactéria cultivada só é viável por testes bioquímicos e de sensibilidade a drogas, os quais requerem um longo período e podem evidenciar inespecificidade (FUVERKI et al., 2008).

O uso de técnicas e métodos envolvendo biologia molecular, como a Reação em Cadeia Polimerase (PCR), tem diminuído o tempo necessário para o diagnóstico da bTB. Diversos trabalhos demonstram o uso da PCR para complementar a identificação do *M. bovis* (ZUMÁRRAGA, 2012; BARANDIARAN, 2019; FICO, 2019), como o trabalho de Elsayed (2019), que utilizou a PCR direto da amostra de tecidos, demonstrando a rapidez da técnica comparada ao cultivo para a identificação da espécie.

Sales et al. (2014) compararam diferentes iniciadores para detecção de *M. bovis*, comprovando que os iniciadores Mb.400, tendo como alvo fragmentos franqueando a região de diferenciação 4 (RD4), são os que demonstraram melhores resultados na PCR para bTB. A região RD4, que engloba os genes rv1506 – rv1516, está deletada no genoma de *M. bovis* e *M. bovis* BCG, embora esteja presente no genoma dos outros membros do CMT (BROSCH et al., 2002).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é uma classe de microrganismos com grande igualdade genética. O genoma de *M. bovis* tem 99,95% de semelhança com *M. tuberculosis*; as deleções no DNA são uma das principais contribuições dessas diferenças. Com isso, a importância de se identificar as espécies dos isolados do CMT para estudos epidemiológicos e saúde pública (ZIMPEL, 2017).

A tuberculose em espécies de zoológicos ou vida livres situadas em parques nacionais constitui a maioria dos casos relatados da doença na literatura. Em um Jardim Zoológico de Curitiba, localizado no sul do Paraná, Brasil, foi descrito o caso de um bisonte (*Bison bonasus*) de 13 anos, nascido em cativeiro que apresentou perda de peso, diarreia, tosse e secreção nasal purulenta que levaram à sua morte (ZIMPEL et al., 2017). Na necropsia do animal, foi observado aumento dos linfonodos, áreas de consolidação multifocais nos lobos pulmonares, sendo esses nodos em sua maioria firmes e de aparência amarelo pálido, com uma massa caseosa central contendo material branco firme consistente com mineralização; como já havia relatos de tuberculose em outras espécies neste mesmo zoológico, seguiram com o cultivo bacteriológico e utilização da técnica de PCR, para confirmar a presença de *M. bovis* (ZIMPEL et al., 2017).

Animais infectados, cativos ou em liberdade, podem disseminar a doença para outras espécies mantidas em cativeiro ou em regiões próximas, como fazendas e outras criações (BARASONA et al., 2016; ZIMPEL et al., 2017), como também para seres humanos em proximidade com esses animais (DE LA RUA-DOMENECH, 2006), causando assim transmissão interespecie.

A transmissão de bTB de animais silvestres para tratadores também é uma preocupação. Alpacas infectadas com *M. bovis* foram fonte de infecção para uma tratadora, que apresentou quadro clínico semelhante a uma gripe grave. Por meio de radiografia do tórax, revelou-se uma suspeita de tuberculose pulmonar, confirmada após cultivo de escarro (BARKHAM, 2012).

A tuberculose bovina continua sendo uma doença de grande importância em bovinos e humanos. Porém, como discutido ao longo do presente trabalho, os animais silvestres podem ser uma potencial fonte de infecção e uma das causas da ineficácia na erradicação da doença (DI MARCO et al., 2012). Sendo assim, é de suma importância, tanto para saúde animal quanto saúde pública, realizar o diagnóstico de bTB nessas espécies e, a partir disso, restringir o trânsito animal e a eutanásia de animais infectados, quando necessário.

Não foi possível, neste estudo, verificar a origem da tuberculose bovina detectada nos cervídeos. Para tanto, estudos de genotipagem dos isolados de cervídeos e de bovinos, da mesma região, são necessários para investigar se a transmissão ocorreu a partir de bovinos infectados, ou outra origem.

Conclusão

Confirmou-se surto de tuberculose bovina em cervídeos de cativeiro no Estado do Rio Grande do Sul, com presença de lesões sugestivas da doença e confirmação por cultura e PCR.

Referências

BARANDIARAN, S.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.; MARFIL, M.J.; MARTÍNEZ VIVOT, M.; AZNAR, N.; ZUMÁRRAGA, M.; PEREZ, A.M. Bayesian Assessment of the Accuracy of a PCR-Based Rapid Diagnostic Test for Bovine Tuberculosis in Swine. **Frontiers in veterinary Science**. vol. 6, n. 204, p. 1-08, 2019.

BARKHAM, P. Fears alpacas could spread bovine TB IN: **The Guardian**, 2012. Disponível em: <<https://www.theguardian.com/environment/2012/may/14/fears-alpacas-spread-bovine-tb>>. Acesso em: out. 2019.

BARASONA, J.A.; VICENTE, J.; DíEZ-DELGADO, I.; AZNAR, J.; GORTÁZAR, C.; TORRES, M.J.; Environmental presence of Mycobacterium tuberculosis complex in aggregation points at the wildlife/livestock interface. **Transbound Emerg**, v. 64, n. 4, p. 1148-1158, 2016.

BROSCHE, R.; GORDON, S.V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A New Evolutionary Scenario for the Mycobacterium Tuberculosis Complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, v. 99, n. 06, p. 3684–3689, 2002.

DELAHAY, R.J.; SMITH G.C.; BARLOW A.M.; HARRIS, A.; CLIFTON-HADLEY, R.S.; CHEESEMAN C.L. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. **Veterinary Journal**, v.173, n.2, p.287–301, 2007.

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

DI MARCO, V.; MAZZONE, P.; CAPUCCHIO, M.T.; BONIOTTI, M.B.; ARONICA, V.; RUSSO, M.; FIASCONARO, M.; CIFANI, N.; CORNELI, S.; BIASIBETTI, E.; BIAGETTI, M.; PACCIARINI, M.L.; CAGIOLA, M.; PASQUALI, P.; MARIANELLI, C. Epidemiological significance of the domestic black pig (*Sus scrofa*) in maintenance of bovine tuberculosis in Sicily. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n.4, p. 1209–1218, 2012.

EMBRAPA. Diagnóstico Veterinário por Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima: Revisão Atualizada. **Documentos145, ISSN 1982-5390**, 2015.

ELSAIED, M.S.A.E.; AMER, A. The rapid detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex members from cattle and water buffaloes in the delta area of Egypt, using a combination of real-time and conventional PCR. **Molecular Biology Reports**. v.46, n. 4, p. 3909–3919, 2019.

FICO, R.; MARIACHER, A.; FRANCO, A.; CIARROCCA, E.; PACCIARINI, ML.; BATTISTI, A. Systemic tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in a free-ranging marsican brown bear (*Ursus arctos marsicanus*): a case report. **BMC Veterinary Research**. v. 15, n.1 p.152, 2019.

FUVERKI, R. B. N., MURAKAMI, P. S., BIONDO, A. W., et al. "Uso da PCR para Detecção e Identificação de Micobactérias a Partir de Amostras Clínicas de Bovinos", **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, pp. 73– 77, 2008.

KOHL, T.A.; UTPATEL, C.; NIEMANN, S.; MOSER, I. *Mycobacterium bovis* Persistence in Two Different Captive Wild Animal Populations in Germany: a Longitudinal Molecular Epidemiological Study Revealing Pathogen Transmission by Whole-Genome Sequencing. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 9, p. 302-18 2018.

MAKOVCOVA, J.; BABAK, V.; SLANY, M.; SLANA, I. Comparison of methods for the isolation of mycobacteria from water treatment plant sludge. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 1165-1179, 2015.

MILLER, R. E.; MURRAY E. F. Current diagnostic methods for tuberculosis in zoo animals. **Zoo and Wild Animal Medicine**, v. 6, p.10-19, 2008.

MOL, J. P. S.; CARVALHO, T. F.; FONSECA JR, A. A.; SALES, E. B.; ISSA, M. A.; REZENDE, L. C.; HODON, M. A.; TINOCO, H. P.; MALTA, M. C. C.; PESSANHA, A. T.; PIERZAN, F.; MOTA, P. M. P. C.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* in a Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) **Journal of comparative pathology**, v. 155, n. 2-3, p.254-258, 2016.

OIE (World Organization for Animal Health). Bovine tuberculosis. Cap. 3.4.6, p. 1058-1074. In.: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2019. Disponível em: <<https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: out. 2019.

RIBEIRO, V. L.; SOUZA S.O.; CASAGRANDE, R.A.; WOUTERS, A.T.B.; WOUTERS, F.; ROLIM, V.M.; SANTOS, E.O.; DRIEMEIER, D. Infecção por *Mycobacterium* sp. em herbívoros selvagens de cativeiro no Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo e detecção imuno-histoquímica (2003-2015). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.37, n.1, p.58-65, 2017.

ROCHA, V.C.M.; CORRÊA, S.H.R.; OLIVEIRA, E.M.D.; RODRIGUEZ, C.A.R.; Fedullo, J.D.; MALTRONE, M.; SETZER, A.; YUKA, C.Y.; VERAJANO, 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**, v.42, n.2, p.726-728, 2011

RUGGIERO, A.P.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A.; ROXO, E. Artigo de Revisão Tuberculose Bovina: Alternativas para o Diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.74, n.1, p.55-65, 2007.

SALES, M.L.; FONSECA, A.A.; SALES, É.B.; COTTORIELLO, A.C.P.; ISSA, M.A.; HODON, M.A.; FILHO, P.M.S.; RAMALHO, A.K; SILVA, M.R.; LAGE, A.P.; M.B, HEINEMANN. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia Microbiol.** v. 59, n. 5, p.433 - 438, 2014.

USDA - United States Department of Agriculture, Bovine Tuberculosis Eradication. Uniform Methods and Rules, **Animal and Plant Health Inspection Service**, 2005.

ZIMPEL, C. K.; BRUM, J. S.; DE SOUZA FILHO, A. F.; BIONDO, A. W.; PEROTTA, J. H.; DIB,

C. C.;... GUIMARAES, A. M. *Mycobacterium bovis* in a European bison (*Bison bonasus*) raises concerns about tuberculosis in Brazilian captive wildlife populations: a case report. **BMC research notes**, v.10, n. 91, 2017.

ZIMPEL, C. K.; BRANDÃO, P.E.; FILHO, A.F.S.; SOUZA, R.F.; IKUTA, C. Y.; FERREIRA NETO, J.S.; CAMARGO, N. C. S.; HEINEMANN, M.B.; GUIMARÃES, A. M. S. Complete Genome Sequencing of *Mycobacterium bovis* SP38 and Comparative Genomics of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* Strains. **Frontiers in Microbiology**. v.8, 2017.

ZUMÁRAGA, M.J.; ARRIAGA, C.; BARANDIARAN, S.; COBOS-MARÍN, L.; DE WAARDE, J.; ESTRADA-GARCIA, I.; FIGUEIREDO, T.; GIMÉNEZE, F.; GOMES, H.M.; GONZALEZ Y MERCHAND, A.; MACÍAS, F.; MILIÁN-SUAZO.; RODRÍGUEZ, C. A. R.; SANTILLÁN, M.A.; SUFFYS, P. N.; TRANGONI, M.D.; ZÁRRAGAHA, M.A.; CATALDI, A. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. **Research in Veterinary Science**. v. 94, n. 1, p. 9-21, 2012.

Embrapa

Gado de Corte



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 15974