TATIANA ALMEIDA VALVASSOURA

**Tuberculose em primatas não humanos mantidos em
cativeiro: uma revisão**

São Paulo

2011

TATIANA ALMEIDA VALVASSOURA

Tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro: uma revisão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, 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)

T.2526
FMVZ

Valvassoura, Tatiana Almeida

Tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro: uma revisão /
Tatiana Almeida Valvassoura.-- 2011.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Tuberculose. 2. Primatas não humanos. 3. Micobactéria. 4. Prevenção.
5. Quarentena. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro: uma revisão de literatura", protocolado sob o nº 2494/2011, utilizando não utilizando animais, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 7/12/2011.

We certify that the Research "Tuberculosis in nonhuman primates in captivity: a review of the literature", protocol number 2494/2011, utilizing not using animals, under the responsibility Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/7/2011.

São Paulo, 8 de dezembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VALVASSOURA, Tatiana Almeida

Título: Tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro: uma revisão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 06/02/2012

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Monica F.K. Gunnwien Julgamento: Aprovado
Instituição: CDA / SAA-SP

Prof. Dr.: Andrea Wicke Moreno Julgamento: Aprovado
Instituição: FMVZ-USP

Prof. Dr.: Jon'han F. Neto Julgamento: aprovado
Instituição: FMVZ-USP

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Soares, pela orientação, confiança, amizade e ensinamentos importantes para a minha vida profissional.

As técnicas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas Zenaide e Gisele, pela amizade e aprendizado durante minha passagem pelo laboratório.

Aos amigos e estagiários do Laboratório de Zoonoses Bacterianas pela amizade, cooperação e ensinamentos.

Aos funcionários da Biblioteca pela ajuda e sugestões.

A minha família e amigos pela compreensão, amor e ajuda.

Ao meu gato, Júnior, de 20 anos de idade, que me viu crescer e virar a veterinária que cuida dele.

Ao meu cachorro, Tody, que abandonado pela mãe com um dia de vida, foi meu sucesso como médica veterinária.

E a Deus, pela ajuda, saúde e força espiritual.

RESUMO

VALVASSOURA, T. A. **Tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro: uma revisão.** [Tuberculosis in nonhuman primates in captivity: a review]. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A Tuberculose vem acometendo animais selvagens desde o surgimento das primeiras coleções organizadas. Particularmente, macacos são altamente suscetíveis as micobactérias, gerando grandes perdas econômicas para as instituições, além do risco de transmissão para o homem e animais. As principais micobactérias, que causam a doença em primatas em cativeiro, são o *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*. Acredita-se que primatas do “novo mundo” são menos suscetíveis do que os do “velho mundo”, entretanto observa-se que tuberculose tem sido documentada em várias espécies. A principal forma de transmissão é através de aerossóis contendo os bacilos. A doença pode evoluir para a forma ativa ou latente, dependendo do estado imunológico do animal. Os sinais clínicos podem ser insidiosos, com somente uma alteração comportamental, seguido por anorexia e letargia, alterações respiratórias ou simplesmente o animal pode aparecer morto no recinto. O diagnóstico clínico é difícil e problemático, sendo que muitas vezes as lesões consistentes com a doença só são observadas na necropsia. Por isso o uso de outras ferramentas de diagnóstico é importante, como o teste de tuberculinização, cultivo e isolamento bacteriano, que são os mais usados na rotina das instituições, e os exames radiográficos do tórax e abdômen, testes moleculares e sorológicos. Toda instituição que mantém primatas em cativeiro deveriam possuir programas de prevenção para evitar a entrada da micobactéria dentro da coleção, principalmente ao se adquirir novos animais. Por isso, o emprego de medidas de biossegurança é essencial para diminuir o risco de doenças para o homem e para os animais dentro das instituições. Essas medidas consistem na implantação de uma série de procedimentos e normas operacionais rígidas, como programas de quarentena, programas de saúde para os funcionários e formação de equipe capacitada e treinada.

Palavras - chave: Primatas não humanos. Tuberculose. Micobactérias. Prevenção. Quarentena.

ABSTRACT

VALVASSOURA, T. A. **Tuberculosis in nonhuman primates in captivity:** a review. [Tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro: uma revisão]. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Tuberculosis has been affecting wild animals since the arising of the first organized collections. Specially, monkeys are highly susceptible to mycobacteria, which cause great economic losses in the institutions, beyond the risk of transmission to man and animals. The main species of mycobacteria, that cause disease in nonhuman primates in captivity, are *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. It is believed that nonhuman primates from the “new world” are less susceptible than the “old world” ones, however it is noted that tuberculosis has been continually documented in several species. Aerosols that contain infectious bacilli are the main transmission mode. The disease can progress to active or latent form, which depends on the animal’s immune status. The clinical signs can be insidious, with only a behavior change, followed by anorexia and lethargy, respiratory alteration or the animal can appear dead in the room. The clinical diagnostic is difficult and problematic, and often lesions are only observed at necropsy. Therefore, the use of other diagnostic tools is important, as the tuberculin skin test, bacterial culture and isolation, that are most used during the routine of institutions, and radiography of the chest and abdomen, molecular and serological tests. Every institution that maintains nonhuman primates in captivity should have prevention programs to avoid the entry of mycobacteria inside of collection, mainly when new animals are acquired. Thus, the use of biosecurity measures is essential to reduce the risk of disease in humans and animals within institutions. These measures consist in implanting series of rigid procedures and operational standards, like quarantine programs, health programs for employees and formation of the qualified team.

Keywords: Nonhuman primates. Monkeys. Tuberculosis. Mycobacteria. Prevention. Quarantine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A casa da girafa no Jardim Zoológico de Berlin, 1890.....	12
Figura 2 -	Macacos em cativeiro igualmente fascinados como aqueles que vieram observá-los.....	12
Figura 3-	Jardim da Aclimação aberto em 15 de fevereiro de 1861.....	13
Figura 4 -	Linfonodo mediastínico de macaco rhesus com exsudato caseoso evidenciado ao corte, em decorrência da infecção por tuberculose.....	23
Figura 5 -	Células gigantes multinucleadas (seta) em granuloma não encapsulado em linfonodo de macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>).....	24
Figura 6 -	Pulmão de macaco rhesus com células gigantes multinucleadas.....	24
Figura 7 -	Osteomielite crônica, com tecido mole adjacente inchado, em fêmur de macaco causado pela infecção por tuberculose. Alguns primatas com achados radiológicos de espondilites ou osteomielites deveriam se investigados para tuberculose	26
Figura 8 -	Abscesso cutâneo na região femoral macaco <i>Aotus</i> em decorrência da infecção por tuberculose.....	27
Figura 9 -	Inoculação intradérmica de tuberculina em pálpebra de macaco.....	31
Figura 10 -	Macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) com reação positiva ao teste de tuberculinização usando MOT, que foi aplicado na pálpebra superior esquerda, apresentando inchaço e eritema no local.....	32
Figura 11 -	Teste Prima TB STAT-PAK®. A figura da esquerda representa resultado negativo e a figura da direita, resultado positivo; na janela do teste, a linha mais acima presente em ambos é a banda controle; a linha mais abaixo marcada por uma seta é a banda que indica resultado positivo.....	38
Figura 12 -	Células gigantes multinucleadas com bacilos álcool-ácido resistentes (setas), coloração Ziehl-Neelsen, em tecido pulmonar de macaco rhesus infectado com <i>M. tuberculosis</i>	39
Figura 13 -	Pulmão de macaco rhesus com granulomas (setas).....	45
Figura 14 -	Equipamentos de proteção individual são importantes quando se trabalha com primatas não humanos.....	60
Figura 15 -	Placas de avisos devem ser visíveis para funcionários e visitantes.....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 ETIOLOGIA.....	16
3 EPIDEMIOLOGIA.....	19
4 PATOGENIA.....	22
5 SINAIS CLÍNICOS.....	26
6 MÉTODOS DIAGNÓSTICO.....	28
6.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO INDIRETO.....	29
6.1.1 Teste de tuberculinização intradérmico.....	29
6.1.2 PRIMAGAM® -IFN.....	34
6.1.3 ELISPOT (<i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>).....	36
6.1.4 ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>) e outros testes sorológicos...	36
6.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRETO.....	39
6.2.1 Métodos de coloração em lâminas e Cultura bacteriana.....	39
6.2.2 Técnicas moleculares.....	41
7 EXAMES RADIOGRÁFICOS.....	44
8 NECROPSIA E ACHADOS MICROSCÓPICOS.....	45
9 TRATAMENTO.....	47
10 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	48
10.1 AQUISIÇÃO DE NOVOS ANIMAIS.....	48
10.2 QUARENTENA.....	51
10.3 ROTINA DE TESTES PÓS-QUARENTENA.....	55
10.4 ESTRUTURA, LIMPEZA E DESINFECÇÃO DOS RECINTOS.....	56
10.5 PROGRAMAS DE SAÚDE DOS FUNCIONÁRIOS.....	59
11 REFLEXÕES FINAIS.....	62
12 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O desejo de se ter uma coleção de animais e plantas é antigo. Várias civilizações possuíam este 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. Eles capturavam leões, gatos selvagens e babuínos durante as viagens e batalhas e os mantinham em seus templos. Os cidadãos comuns adotaram este 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, 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 novamente 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 com seus deuses, como exemplo 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 destas 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 às

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, p.52) 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 servia para que Willian Harvey estudasse 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, sendo que somente em 1847 é que o zoológico foi aberto à visitação pública (HEDIGER, 1964).

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 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). Estes zoológicos eram utilizados para a introdução de novas espécies vindas principalmente das colônias para a Europa, onde eram capturados direto da natureza. Houve uma tentativa de domesticação e algumas vezes reprodução destes animais, o que era chamado na época de aclimatização. O sucesso da aclimatização com animais foi limitado, já que a sua manipulação não era fácil e seus hábitos alimentares e reprodutivos não eram bem conhecidos. Com isso muitos animais morreram. Os recintos eram pequenos, construídos basicamente para favorecer uma boa visualização dos animais pelo público e não havia a preocupação em garantir adequadas condições de vida em cativeiro (Figuras 1 e 2). Já 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, p. 38).

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

² OSBORNE, 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 Berlin, 1890.
 Fonte: (KEMPTER³, 1890 apud HOCHADEL, 2005, p. 40)

Figura 2 - Macacos em cativeiro igualmente fascinados como aqueles que vieram observá-los.
 Fonte: (DORÉ⁴, 1872 apud HOCHADEL, 2005, p. 40)

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

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, p. 39)

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, com a reprodução de algumas condições do seu habitat natural. Diante deste 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 estes zoológicos era o de mostrar os animais, especialmente os exóticos e sempre priorizando 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).

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).

⁵SAINT-HILAIRE, I. G. Jardin d'Acclimatation. Image reproduced from *L'Illustration*, 1861, p.136–137.

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.

O confinamento dos animais selvagens de diferentes regiões geográficas, geralmente 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 da metade do século dezenove até a metade do século vinte em zoológicos dos Estados Unidos e da Europa (HINES; KREEGER; HERRON, 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; MIKOTA; CHENG, 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*. Essas micobactérias são altamente virulentas e patogênicas para várias espécies de animais, principalmente para os macacos, que são bastante suscetíveis, podendo tornar-se fonte de infecção para o ser humano (UNI; MORI, 2007). Em zoológicos, observou-se alta incidência da infecção em primatas causados principalmente pelo *M. tuberculosis*, com perdas acima de 40% em algumas coleções (RUCH⁸, 1959 apud MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001, p. 291). Em animais de vida livre, localizados em áreas distantes da ocupação humana e sem contato direto com o homem, é muito raro a observação da doença; porém, curiosamente, nas últimas décadas, a tuberculose em animais de vida livre tem alcançado níveis preocupantes em alguns países, notadamente em babuínos e leões nos parque africanos (CLIFTON-HADLEY et al., 2001; LISLE et al., 2002; CORNER, 2006; 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.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), em 2010 estimou-se 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),

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

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

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 não imunocompetentes. Em decorrência destes fatos autoridades em saúde pública vem se preocupando com o desenvolvimento de resistência aos antibióticos pelas micobactérias (TIRUVILUAMALA; REICHMAN, 2002), que é um problema que está se agravando com os anos. Houve uma estimativa de 250.000 casos de pacientes com bactérias resistentes a várias drogas em 2009 (WHO, 2010) e em 2010 a estimativa foi de 290.000 casos (WHO, 2011).

Apesar dos avanços em relação ao controle da tuberculose humana e da tuberculose em animais de produção, essa doença ainda é um dos principais problemas sanitários em coleções de animais silvestres mantidas em cativeiro, principalmente de primatas não humanos. Assim, essa 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

Tuberculose é uma das mais importantes doenças bacterianas de primatas não humanos por causa da sua natureza insidiosa, da sua frequência, por se espalhar rapidamente, por causar altas taxas de mortalidade e por seu potencial zoonótico. Ela é causada principalmente por duas espécies de bacilos intracelulares aeróbios facultativos: *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*, pertencentes ao Complexo *Micobacterium tuberculosis* (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 pelas seguintes espécies de bacilos: *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose em humanos; *M. africanum* (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), principal agente de tuberculose em humanos no continente Africano, com 60% dos casos da doença diagnosticada; *M. bovis* 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*, usada como vacina, como veículo recombinante para outras vacinas e como tratamento imunogênico; *M. Canettii*, que se considera como uma variante lisa de *M. tuberculosis*, raramente encontrada, que causa doença no homem; *M. microti*, agente causador da doença em pequenos roedores; *M. caprae*, infecta principalmente caprinos, mas também pode infectar o homem, descrito na Europa; e *M. pinnipedii*, é a espécie que causa tuberculose em pinípedes, já detectados em focas de vários continentes (BROSMAN, 1992; VAN SOOLINGEN et al., 1997; ARANAZ et al., 1999; BROSCH et al., 2001; NIEMANN et al., 2002; COUSINS et al., 2003; NIEMANN et al., 2004; PALMER, 2007).

A maioria das micobactérias são saprófitas, tendo como habitat o solo e a água, vivendo em vida livre e estando raramente envolvidas em processos patogênicos. Entretanto existem aquelas que são oportunistas e 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, respectivamente. (BROSCH et al., 2002; FU; FU-LIU, 2002). Consistem em bastonetes aeróbios, intracelulares facultativas, não capsuladas, sem mobilidade, não esporulados e álcool-ácido resistentes, com tamanho de 0,2 a 0,6 x 1 a 10 µm (MURRAY et al.⁹, 1998 apud KANEENE; THOEN, 2004, p. 686; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A parede celular desses bacilos é muito complexa e rica em lipídeos. Várias características, assim como a relação com o hospedeiro, estão diretamente ligadas a 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 álcool-ácido; e aglutinação são determinadas em decorrência do alto teor de lipídeos da parede celular (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Ela é composta por dois segmentos: um inferior e outro superior. O segmento superior é composto por lipídeos livres, alguns com longas cadeias de ácidos graxos complementando cadeias α mais curtas, e outros com cadeias mais curtas de ácidos graxos complementando cadeias α mais longas. Intercaladas entre os lipídios livres nesta porção estão as proteínas e os glicolipídeos. Os glicolipídeos, como a molécula de lipoarabinomana e suas variantes, são responsáveis pela resposta inflamatória granulomatosa (BRENNAN, 2003). A porção inferior, em contato com a membrana plasmática, é o núcleo insolúvel, essencial para a viabilidade da célula bacteriana, e é formada por peptideoglicanos em ligação covalente com a arabinogalactana, que por sua vez está ligado aos ácidos micólicos, que confere a característica álcool-ácido resistente, com suas longas cadeias de meromicolato e curtas cadeias α . Esta estrutura compacta e organizada é o principal componente da parede celular formando seu esqueleto e 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 por exemplo, a adição de solventes, os lipídeos livres e as proteínas são dissolvidos, mas o complexo formado pelo ácido micólico, a arabinogalactana e o peptideoglicano permanece como um resíduo insolúvel (BRENNAN, 2003).

A estrutura da parede celular também está relacionada à virulência destas bactérias. O fator corda, os sulfolipídeos, os micosídeos e as lipoarabinomanas funcionam como mediadores da virulência, através de mecanismos como a promoção da persistência intracelular e a inibição da ativação de macrófagos (TOOSI; ELLNER, 2000).

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.

A resistência as 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, se comparado com outros patógenos. Ambientes com alta umidade e baixa incidência de luz solar são bastante propícios para a sua sobrevivência, sendo sensíveis ao calor e a radiação ultravioleta. Pesquisas mostram que nas fezes e no solo elas conseguem sobreviver por até 2 anos, na água por até 12 meses e na carcaça por 10 meses, dependendo das condições ambientais favoráveis (WHO, 1984).

Em programas de sanidade animal é essencial o conhecimento dessas características da célula micobacteriana, pois a resistência as condições ambientais e aos desinfetantes interfere diretamente na eficiência das medidas de controle ambiental.

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 70, devido à introdução de barreiras físicas nos recintos e a aplicação dos protocolos de quarentena, tuberculose ainda é um dos principais problemas sanitários nesses 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 gasto com custo para o controle da doença (LERCHE et al., 2008).

Na cidade de Londres o registro mais antigo de tuberculose em Zoológico foi feito por Owen em 1836, em um chimpanzé (OWEN¹⁰, 1836 apud MONTALI; MIKOTA; CHENG, 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” (SCOTT¹¹, 1930 apud O'REILLY; DABORN, 1995, p. 9).

Wilson e colaboradores (1984) relataram um surto de tuberculose que ocorreu no zoológico de Dublin causada por *M. bovis* em várias espécies de primatas (*Lemur mayottensis*, *Erythrocebus patas*, *Macaca silenus*, *Symphalangus syndactylus*) que se encontravam na área de isolamento do zoológico. 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, infecção por *M. tuberculosis* ocorreu em macacos-rabo-de-porco (*Macaca nemestrina*), orangutangos e chimpanzés. Mais recentemente em um cativeiro na área de Kansai, dois macacos japoneses (*Macaca fuscata*) que morreram em julho e outubro de 2004 foram diagnosticados com *M. tuberculosis*. Os outros animais que viviam no mesmo local foram positivos no teste de tuberculinização e eutanasiados. Outro surto em um zoológico no ano de 2004, 4 macacos da espécie *Colobus guereza* e 8 macacos da espécie *Cebus apella* morreram ou tiveram teste de tuberculinização positivo e foram eutanasiados.

¹⁰ OWEN, R. On the morbid appearance observed in the dissection of a chimpanzee (*Simia troglodytes*). 1836 apud RITCHIE, J. N.; MACRAE, W. D. Tuberculoses 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 Counc. Spec. Ser.**, London: HMSO, 1930. n. 149, p. 270.

Ambas as espécies estavam infectadas por *M. tuberculosis*. Em seguida 4 funcionários, sendo 2 veterinários que fizeram a necropsia destes animais, tiveram o teste positivo para tuberculose e um dos veterinários desenvolveu a doença. (UNE; MORI, 2007).

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

A tuberculose não existe em primatas selvagens na natureza, que vivem longe de habitações humanas, sendo o contato com o homem contaminado a principal fonte de transmissão do *M. tuberculosis* para esses animais (KAUFMANN; ANDERSON¹², 1978 apud MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001, p. 292). Casos da doença causado por *M. tuberculosis* tem sido detectados em babuíños selvagens de vida livre na área peri-urbana em Cape Town, África do Sul, provavelmente decorrente do comportamento desses animais de mexer no lixo humano. Este comportamento também tem sido associado a surtos de tuberculose causados por *M. bovis* em babuíños de vida livre (KEET et al., 2000; PARSONS et al., 2009).

Apesar de todas as espécies de primatas serem suscetíveis tanto a infecção pelo *M. tuberculosis*, como pelo *M. bovis*, observa-se que existe 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 os mais suscetíveis para *M. bovis* e *M. tuberculosis* do que os grandes primatas não humanos (gorila, orangotango e chimpanzé), que parecem ser mais suscetíveis que os primatas do “novo mundo” (MONTALI et al., 2001), entretanto observa-se que 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; MIKOTA; CHENG, 2001, p. 292), 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 ocorrendo em menos de um ano. As espécies *Callitrix*, *Cebus*, *Ateles* e *Saimiri* parecem ser mais suscetíveis entre as espécies do “novo mundo”, enquanto que o gênero *Aotus* parece ter certo grau de resistência para a doença (BONE; SOAVE, 1970; MORELAND, 1970; LEATHER; HAMM, 1976; FORTMAN; HEWETT; BENNETT¹³, 2001 apud ALFONSO et. al., 2004, p. 291).

¹²KAUFMANN, 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.

¹³FORTMAN, J. D.; HEWETT, T. A.; BENNETT, B. T. *The Laboratory Nonhuman Primate*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001.

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 espirra (FRANCIS, 1971; SAPOLSKY; ELSE, 1987; DALOVISIO; STETTER; MIKOTA-WELLS, 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; STETTER; MIKOTA-WELLS, 1992).

Outras formas de transmissão geralmente ocorrem através de brigas (mordidas), fômites e através de procedimentos médicos com materiais contaminados (KING, 1993; KAUFMANN; ANDERSON¹⁴, 1978 apud MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001, p. 292). Algumas condições, como a lotação dos recintos, com grande quantidade de animais, e uma alimentação deficiente, aumentam a probabilidade da doença se espalhar e progredir rapidamente entre os animais (MCMURRAY; BARTOW, 1992).

A eliminação da micobactéria pode ocorrer 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 ter uma grande quantidade de bacilos nas fezes, podendo formar aerossóis durante a limpeza dos recintos (GOOD, 1984).

O conhecimento das formas de transmissão e eliminação do agente etiológico é essencial para se obter sucesso no controle da disseminação da doença nas instituições mantedoras de primatas em cativeiro.

¹⁴KAUFMANN, 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.

4 PATOGENIA

A doença geralmente se desenvolve de forma aguda, crônica, progressiva ou de forma latente (RENQUIST; WHITNEY, 1978; MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; FROST, 2006). O tempo necessário para a sua manifestação pode ser influenciado de acordo com a cepa, com a dose infectante, a porta de entrada e as condições imunológicas do animal (THOEN; BARLETTA¹⁵, 2004 apud KANEENE; THOEN, 2004, p. 686).

De acordo com a espécie e a forma de transmissão, o bacilo da tuberculose pode alcançar o pulmão ou o intestino onde eles são fagocitados por macrófagos residentes nos tecidos. A característica lipídica da parede celular das micobactérias, em especial o “fator corda”, confere uma relativa resistência às enzimas lisossomais e aos processos oxidativos que ocorrem dentro dos fagossomos, permitindo que elas sobrevivam e se multipliquem no interior de alguns macrófagos, causando a morte dessas células e consequentemente a sua liberação. Outros macrófagos, que são capazes de matarem as 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 eles se tornam ativos pelas citocinas liberadas pelos linfócitos reativos e pelos macrófagos, e ajudam a fagocitar os bacilos liberados pelos macrófagos mortos (KING, 1993; MONTALI; MIKOTA; CHENG, 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 epitelióides com membranas que se interdigitam com outras células desse mesmo tipo numa tentativa de impedir a disseminação da infecção. Conforme ocorre a morte dessas células, outras surgem para substituí-las e cercar esse material, formado por restos celulares e por micobactéria em sua região mais central. Os linfócitos T citotóxicos desempenham um papel importante na ativação e recrutamento das células epitelióides e eventual destruição dos bacilos cercados por elas, formando as áreas centrais de necrose de caseificação que caracteriza um granuloma tuberculoso (Figura 4). Os granulomas podem aumentar de tamanho formando massas caseosas, que tem a tendência a 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

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.

espécies. Pode-se observar, em alguns animais, 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 acabar encapsulando a lesão. Em animais que apresentam a doença de forma latente observam-se poucos granulomas, sendo a maioria fibrosos. As células de Langhans (Figuras 5 e 6), que são células gigantes multinucleadas formadas através da fusão de macrófagos ativados, podem estar presentes nos granulomas em pouca quantidade ou até mesmo ausentes (KING, 1993; MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; FLYNN et al., 2003; KANEENE; THOEN, 2004; FROST, 2006). Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, que leva de um a dois meses para serem detectáveis em testes sorológicos, podendo apresentar antígenos, e também estão presentes na estrutura do granuloma, mas sua participação na resposta imune contra a tuberculose ainda não está completamente elucidada (FLYNN; CHAN, 2001).

Figura 4 - Linfonodo mediastínico de macaco rhesus com exsudato caseoso evidenciado ao corte, em decorrência da infecção por tuberculose.

Fonte: (SHIPLEY et al., 2008)

Figura 5 - Célula gigante multinucleada (seta) em granuloma não encapsulado em linfonodo de macaco rhesus (*Macaca mulatta*).

Fonte: (SHIPLEY et al., 2008)

Figura 6 - Pulmão de macaco rhesus com células gigantes multinucleadas.

Fonte: (LEWINSOHN et al., 2006)

Ao mesmo tempo existe outra porção dos macrófagos que transportam os bacilos da tuberculose para os linfonodos regionais e para outros tecidos onde o processo começa novamente. 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, respectivamente, constitui-se aquilo que é denominado como complexo primário (KING, 1993; CAPUANO et al., 2003; FLYNN, 2003; ISAZA, 2003; KANEENE; THOEN, 2004).

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, e pode progredir de várias maneiras, incluindo nenhuma evidência da doença, doença de evolução rápida e progressiva e 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 natural de infecção pelo *M. tuberculosis* em primatas, no qual macacos adultos cynomolgus são infectados com a inoculação de baixas doses de micobactéria (~25 unidades formadoras de colônia/por animal) diretamente nos pulmões. Como resultado, obteve-se aproximadamente 40% dos animais com tuberculose ativa e em 60% sem nenhum sinal da doença (CAPUANO et al., 2003). Lin e colaboradores (2008), utilizando esse mesmo modelo

de infecção natural pelo *M. tuberculosis*, foram capazes de classificar os animais, passados 6 meses pós-infecção, com doença ativa ou com infecção latente, através de exames clínicos, radiografia do tórax e presença ou ausência de crescimento bacteriano do lavado gástrico e/ou broncoalveolar. Naqueles com tuberculose primária ou ativa foi observado a persistência do crescimento de *M. tuberculosis* em cultura do lavado gástrico e /ou broncoalveolar e alterações radiográficas do tórax. Em contraste, aqueles com infecção latente apresentaram parâmetros clínicos normais, nenhum crescimento de *M. tuberculosis* em cultura de lavado gástrico e/ou broncoalveolar e nenhuma alteração radiográfica do tórax (LIN et al., 2008).

Durante o período de latência os animais saudáveis, sem nenhuma deficiência nutricional e imunocompetentes, possivelmente encontram-se em uma situação temporária de estabilidade e equilíbrio, onde se tem a multiplicação das micobactérias em taxas muito reduzidas, mas que continuam a estimular a resposta celular do hospedeiro devido à contínua liberação de antígenos. Quando a imunidade do animal decai, seja devido a outras infecções imunossupressoras concomitantes ou utilização de drogas imunossupressoras, ou devido a situações estressantes, causados por desequilíbrios nutricionais ou ambientais, ocorre a propagação e disseminação das micobactérias, constituindo-se na tuberculose reativa, que muitas vezes leva a morte do hospedeiro. Os bacilos podem entrar nos vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos e desta maneira alcançar outros órgãos, como fígado, baço, rins, adrenal, medula óssea, linfonodos e meninges. Esta forma generalizada da doença, conhecida como tuberculose miliar, é frequentemente fatal e ocorre principalmente em animais jovens. (KING, 1993; MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; CAPUANO et al., 2003; 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 mantedoras de primatas em cativeiro, pois muitas vezes esses animais podem não ser diagnosticados através dos testes usados atualmente, como a tuberculinização, e serem introduzidos dentro das coleções sadias, onde em determinado momento pode ocorrer a reativação da doença e provocar a transmissão para os outros animais. Por isso a importância do período de quarentena e da aplicação dos testes de diagnósticos em vários intervalos dentro desse período, e depois rotineiramente, de acordo com os programas de sanidade animal.

5 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da tuberculose em primatas podem ser insidiosos, com apenas uma mudança comportamental sendo observada, seguido por anorexia e letargia, ou os animais podem simplesmente morrer de forma fulminante (RENQUIST; WHITNEY, 1978; FORTMAN; MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; HEWETT¹⁶, 2001 apud ALFONSO et. al., 2004, p. 286; FROST, 2006). Os animais que morrem de forma fulminante são geralmente encontrados em excelente estado corporal e na 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 cutâneos, espondilites e osteomielites (Figura 7). (RENQUIST; WHITNEY, 1978; RENQUIST; POTKAY, 1979; MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; FROST, 2006). Feridas supuradas (Figura 8), com linfadenopatia localizada, deveriam ser sempre consideradas como um possível sinal de infecção por micobactéria (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001). Sinais clínicos neurológicos como paresia pode ser resultante da espondilite (FROST, 2006).

Figura 7 - Osteomielite crônica, com tecido mole adjacente inchado, em fêmur de macaco causado pela infecção por tuberculose. Alguns primatas com achados radiológicos de espondilites ou osteomielites deveriam ser investigados para tuberculose.

Fonte: (IALEGIO, 1997)

¹⁶FORTMAN, J. D.; HEWETT, T. A.; BENNETT, B. T. **The Laboratory Nonhuman Primate**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001.

Figura 8 - Abscesso cutâneo na região femoral de macaco *Aotus* em decorrência da infecção por tuberculose.
Fonte: (IALEGHIO, 1997)

Devido a não especificidade dos sinais clínicos, que muitas vezes podem ser parecidos com outras doenças, como neoplasias, micoses sistêmicas, melioidoses (infecção por *Pseudomonas pseudomallei*), nocardioses, ascaridíases pulmonar, enterites bacterianas ou parasitárias, má nutrição e trauma (RENQUIST; WHITNEY, 1978; MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; FROST, 2006), recomenda-se fazer o diagnóstico diferencial e testes laboratoriais complementares (RENQUIST; WHITNEY, 1978).

6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Embora se observe uma significativa redução na incidência de tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro em alguns países, como nos Estados Unidos, onde há uma legislação rígida que regulamenta 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 exposto (BUSHMITZ et al., 2008).

O diagnóstico clínico *ante-mortem* é geralmente difícil e problemático, devido aos sinais inespecíficos da doença, sendo que muitas vezes somente no exame *post-mortem* é que se consegue visualizar as lesões sugestivas da enfermidade. Por isso, a utilização de outras ferramentas para o diagnóstico da doença é importante, como o teste de tuberculinização e sorológicos, exames baseados em imagens do tórax e abdômen, isolamento e identificação do agente pela bacteriologia clássica e testes moleculares utilizados para detecção e identificação do agente (BUSHMITZ et al., 2008; IALEGGIO, 1997; LERCHE et. al., 2008; LIN et al., 2008; MCMANAMON, 2008; WALSH et al., 1996).

Os testes mais usados são o teste de tuberculinização, principalmente em programas de prevenção e quarentena, e o isolamento em meios de cultura artificiais, seguido da identificação por métodos moleculares. Devido a algumas limitações do teste de tuberculinização intradérmico, particularmente sua incapacidade de identificar com segurança animais com infecção latente, e apesar de ainda ser o principal teste de diagnóstico de tuberculose em primatas, outros testes estão sendo desenvolvidos e aperfeiçoados para serem usados nesses animais, como os moleculares e os sorológicos, na tentativa de aumentar a especificidade e a sensibilidade, e assim diminuir os falsos positivos e consequentemente reduzir a quantidade de animais eliminados sem realmente estarem infectados (LERCHE et. al., 2008; LIN et al., 2008; MCMANAMON, 2008; WALSH et al., 1996).

6.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO INDIRETO

Testes indiretos são aqueles baseados na detecção da resposta imunológica desenvolvida quando da presença de um agente etiológico.

6.1.1 Teste de tuberculinização intradérmico

O diagnóstico *ante-mortem* da tuberculose está baseado no teste intradérmico de hipersensibilidade tardia, a tuberculinização, que é a primeira ferramenta para detectar a doença em primatas não humanos, através da inoculação de tuberculina. A tuberculina pode ser definida como um extrato obtido a partir de cultivos filtrados de *Mycobacterium* sp, previamente esterilizados pelo calor, e 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 protéicos purificados (PPD, *purified protein derivative*), que foram desenvolvidos por Seibert em 1834 e são preparados a partir de *M. bovis*, tuberculina mamífera, e *M. avium*, tuberculina aviária, onde as proteínas são separadas do meio de cultura por precipitação, purificadas por lavagens com ácidos e fosfatos e diluídas na concentração adequada para uso (BRASIL, 2006; FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2008). 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). As tuberculinas devem ser mantidas sob a temperatura de 2° a 8° C (não congelar) e têm validade de um ano após a data de fabricação. Os frascos precisam ser protegidos da luz solar direta durante os trabalhos de campo. 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 (BRASIL, 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 3 a 4 semanas pós 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 e, portanto a acurácia do teste, depende de vários fatores incluindo o número de bacilos, a quantidade de células T circulantes e a quantidade de antígeno - específicos usados na preparação da tuberculina (FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2008).

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

Enquanto que outros autores recomendam atualmente a utilização do PPD, porque como o MOT é um produto que pode variar entre os lotes, reações não específicas podem ser observadas em animais não infectados, já o PPD consegue ter um conteúdo mais facilmente padronizado (THOEN; GARCIA-MARIN¹⁷, 2002 apud KANEENE; THOEN, 2004, p. 686; MILLER, 2008). Além disso, MOT é uma preparação resultante de cultura bruta filtrada, que contém antígenos comuns para várias espécies de micobactérias, incluindo aquelas não tuberculosas. Consequentemente, reações cruzadas não são incomuns, o que causa uma baixa especificidade e reações falso-positivas. Além disso, a produção comercial de MOT é um processo lento e o produto resultante, embora essencial para programas de vigilância de primatas, não é rentável. Como resultado, nos EUA há apenas uma empresa fabricante do MOT (Synbiotics, Inc.) (IALEGGIO, 1997; LERCHE et al., 2008). No Brasil não há disponibilidade no mercado dessa tuberculina, sendo somente encontrado o PPD (BRASIL, 2006).

O teste de tuberculinização é realizado inoculando intradermicamente 0,1ml de tuberculina na pálpebra superior próxima a borda ou na pele do abdômen ou em ambos. Em animais pequenos pode-se utilizar 0,05ml de tuberculina. A pálpebra é o local de preferência para a inoculação da tuberculina (Figura 9), pois é de fácil observação. Se o abdômen for usado o pelo deverá ser raspado sem que a pele seja traumatizada e o local da inoculação deverá ser marcado para depois se conseguir fazer a leitura do resultado. A utilização do

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

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., 2008). Outros locais que podem ser utilizados para inoculação são braços e tórax (MILLER, 2008). Não se recomenda a utilização de álcool isopropílico na limpeza do local antes da inoculação, pois algum álcool remanescente poderá ser introduzido no local durante o procedimento e gerar um resultado equivocado ou falso-positivo (IALEGGIO, 1997).

Figura 9 - Inoculação intradérmica de tuberculina em pálpebra de macaco.
Fonte: (UNIVERSITY OF CINCINNATI, 2011)

Nos últimos anos vários pesquisadores vêm recomendando 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 PPD aviário, devido à baixa especificidade das provas de tuberculinização simples, nas quais somente um tipo de PPD é empregado (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; CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006). A reação dos locais de inoculação deve ser observada às 24, 48 e 72 horas após a aplicação das tuberculinas. O resultado é dado pelas alterações observadas no local, como presença de edema e eritema, fazendo com o animal tenha dificuldade de abrir o olho, podendo ter até necrose na região (Figura 10), 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 ocorrer alterações no sítio de inoculação do PPD aviário, mais intensas que no local de inoculação do PPD mamífero, considera-se o animal negativo, uma vez que o complexo *M. avium-intracellulare* é saprófito para os primatas. Em animais anérgicos tem se encontrado uma reação de hipersensibilidade transitória positiva, conhecida como reação “flash”, dentro das 24 horas após inoculação e depois uma reação negativa nas 48 e 72 horas, por isso a importância de se observar as alterações a cada período. É aconselhável que o mesmo indivíduo treinado ou o veterinário deverá interpretar os testes (KING, 1993; IALEGGIO, 1997; CAPUANO et al., 2003).

Figura 10. Macaco rhesus (*Macaca mulatta*) com reação positiva ao teste de tuberculinização usando MOT, que foi aplicado na pálpebra superior esquerda, apresentando inchaço e eritema no local.

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 avançada da infecção, podendo ocorrer resultados falso-negativos. Em estágios mais recentes a resposta mediada por células pode não estar desenvolvida o suficiente, isso 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, é incapaz de montar uma resposta de hipersensibilidade tardia. Geralmente o desenvolvimento da resposta celular se estabelece em aproximadamente quatro semanas após a exposição do animal a micobactéria. O animal pode

também em estágios mais recentes da infecção estar no período de latência, onde muitas vezes o teste de tuberculinização não consegue detectar o primata infectado (POTKAY et al., 1966; IALEGGIO, 1997; ISAZA, 2003; FROST, 2006). Vários casos em que o animal recém adquirido e com teste de tuberculinização negativo durante a quarentena, passa a ser positivo no período pós-quarentena, sem evidências de humanos ou outros animais com tuberculose no novo local, vem ocorrendo e há grandes indícios de que nesses casos tenha ocorrido a reativação de infecções latentes, que não foram detectadas durante a quarentena, onde se obteve uma reação falso-negativa do teste (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, e dessa maneira também se ter uma condição de anergia. Concomitantemente doenças como sarampo ou doenças fúngicas podem também resultar em resultados falso-negativos por causa da imunodepressão (POTKAY et al., 1966; IALEGGIO, 1997; ISAZA, 2003; FROST, 2006). Indivíduos incapacitados de estabelecer uma resposta imune celular, devido à interferência de drogas, em períodos pós-vacinação e idosos, podem comprometer os programas de vigilância contra a doença, gerando resultados negativos, como a vacinação para poliomielite, sarampo e febre amarela (OTT, 1979; STALEY et al., 1995; IALEGGIO, 1997) e as terapias com isoniazida ou tratamentos com drogas imunossupressoras, incluindo corticóides. Além disso, reações falso-negativas podem resultar de incorreta administração, subjetividade na interpretação do teste ou uma concentração abaixo do ideal de antígeno na preparação aplicada (BUSHMITZ et al., 2008).

Reações falso-positivas podem resultar de prévia exposição (experimental) ao adjuvante De Freund na forma completa (solução antígena emulsificada em óleo mineral contendo micobactérias neutralizadas e dessecadas, e usado como um estimulador do sistema imunológico), trauma causado por inapropriada inoculação da tuberculina e em animais vacinados com BCG (DUKELOW; PIERCE, 1987; MALAGA et al., 2004; FROST, 2006). As reações inconclusivas podem ocorrer devido à exposição do animal a contaminantes, como os componentes fenólicos, que podem produzir reações alérgicas, que aparecerem no prazo de 30 minutos depois da inoculação. Além disso, reações cruzadas depois da exposição a atípicas ou saprófitas micobactérias, como *M. goodii*, pode resultar em reação falso-positiva (SOAVE et al., 1981; DUKELOW; PIERCE, 1987; MALAGA et al., 2004; FROST, 2006).

Dentro do grupo dos grandes primatas, que inclui os chimpanzés (*Pan troglodytes*), orangotangos (*Pongo pygmaeus*) e o gorilas (*Gorilla gorilla*), o orangotango reage diferente em relação ao teste de tuberculinização, possuindo mais sensibilidade a tuberculina do que os

outros. Eles podem estar sensibilizados por antígenos de micobactérias não tuberculosas, gerando resultados falso-positivos ou não específicos (CALLE, 1999; FROST, 2006). Para esta 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 de tuberculinização ainda é o mais utilizado e recomendado em programas de prevenção e controle de tuberculose em primatas mantidos em cativeiro.

6.1.2 PRIMAGAM® -IFN

O PRIMAGAM® da Prionics AG é um teste rápido, comercialmente disponível em alguns países como Estados Unidos, Nova Zelândia e Austrália, e utilizado para o diagnóstico de tuberculose em primatas. Nos Estados Unidos o Departamento de Agricultura deu uma licença provisória em 2002 ao PRIMAGAM® para poder ser usado em primatas (LERCHE, 2007).

O teste consiste na detecção e medição de interferon – gamma (IFN- γ) que são liberados quando os linfócitos T são estimulados “in vitro” com tuberculinas (PPD bovino, derivado de *M. bovis* e PPD aviário, derivado de *M. avium*) ou outros antígenos. IFN- γ é uma importante citocina envolvida na resposta imune mediada por células em uma infecção por micobactéria (DENSEM; JONES, 1998; GARCIA et al., 2004; VERVENNE et al., 2004).

Alíquotas padronizadas de sangue total, que deve ser coletado em até 24 horas antes de ser processado, são estimuladas em uma placa de cultura com um controle positivo, um controle negativo e antígenos micobacterianos (PPD bovino e PPD aviário). Depois do período 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 for maior para o PPD bovino o resultado deve ser interpretado como uma indicação de sensibilização por antígenos de *M. tuberculosis* ou *M. bovis*. Se a reação for mais forte para o PPD aviário do que para o PPD bovino o resultado deve ser interpretado como uma sensibilização para *M. avium* ou outras espécies de micobactérias não tuberculosas. Deve-se tomar certo cuidado ao se fazer essa última interpretação, pois existe a possibilidade de alguns animais em estágios iniciais da infecção pelo *M. bovis* ou *M. tuberculosis* ter uma reação

maior para o PPD aviário do que para o PPD bovino, sugerindo nesses casos a realização de mais do que um único teste. Testes subsequentes na maioria das vezes demonstram uma conversão nos resultados, obtendo-se uma resposta dominante de IFN- γ para PPD bovino. Para se evitar resultados falso-negativos, animais que demonstrarem reação mais forte para o PPD aviário devem ser testados novamente após duas semanas (GARCIA et al., 2004; VERVENNE et al., 2004; LERCHE et al., 2008).

Várias espécies de primatas estão sendo testados usando este método, incluindo saguis, gibões, chimpanzés, gorilas, orangotangos, macacos rhesus e cynomolgus (FROST, 2006). Durante um surto de *M. bovis* em *Macaca. mulatta* e *Macaca. fascicularis* utilizou-se esse teste, obtendo-se uma sensibilidade de 68% e especificidade de 97%. Já o teste de tuberculinização intradérmica obteve sensibilidade de 84% e especificidade de 87%. Nesse surto a utilização de ambos os testes detectou todos os animais infectados, aumentando a sensibilidade geral para 100%. Pode-se observar também que na *M. fascicularis* a produção de IFN- γ em resposta ao PPD bovino foi baixa, por isso nestas espécies é recomendado a utilização de outros testes em combinação com o PRIMAGAM®, como o teste tuberculinização (GARCIA et al., 2004). Em geral vários autores aconselham o uso em combinação do PRIMAGAM® com o teste de tuberculinização intradérmica para uma máxima sensibilidade em programas de prevenção de tuberculose, e assim diminuir a possibilidade de resultados falso-positivos ou inespecíficos (LIN et al., 2003; LERCHE, 2007; BUSHMITZ et al., 2008).

Vários pontos críticos devem ser considerados em relação a esse teste. As amostras devem ser processadas dentro de 24 horas após a coleta. Resultados são quantificados e o estabelecimento de valores de corte requer alguma interpretação do operador quando espécies incomuns são testadas (LERCHE, 2007). Evidências mostram também que a sua capacidade de detectar infecções latentes é incerta. Em um estudo feito em macacos cynomolgus observou-se uma incapacidade do teste de detectar tuberculose latente nessa espécie (CAPUANO et al., 2003). Entretanto ele possui algumas vantagens: só é necessário acessar o animal uma única vez para coletar o sangue; os resultados ficam prontos em menos do que 36 horas; e pode-se repetir o teste imediatamente, pois os animais não são inoculados com antígenos (LERCHE et al., 2008).

6.1.3 ELISPOT (*enzyme-linked immunosorbent spot*)

O ELISPOT é um método em que células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são isoladas e contadas, e uma quantidade dessas 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).

Em um estudo, ambos PRIMAGAN® e ELISPOT foram comparados ao teste de tuberculinização em várias espécies de primatas e como resultado achou-se importante a aplicação dos testes em conjunto (VERVENNE et al., 2004).

Esse método de diagnóstico tem sido usado para fins de pesquisa em primatas, não existindo uma versão comercial (LERCHE et al., 2008).

6.1.4 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e outros testes sorológicos

ELISA é o mais comum teste sorológico para o diagnóstico de tuberculose. Vários tipos de antígenos micobacterianos são utilizados para a detecção de anticorpos no material a ser testado. Os recentes avanços no sequenciamento genético do *M. bovis* e do *M. tuberculosis* tem identificado proteínas que pertencem unicamente a essas espécies. Duas dessas proteínas, a ESAT-6 e a CFP-10, são altamente imunogênicas e usadas como antígenos para a detecção de anticorpos específicos para tuberculose em primatas não humanos (LERCHE et al., 2008).

Em um surto de *M. bovis* em macacos rhesus e cynomolgus, 22 dos 25 animais com lesão para tuberculose, evidenciados na necropsia, tiveram anticorpos específicos anti-ESAT-6 detectados, com sensibilidade de 88% e especificidade de 84% para o ELISA, valores próximos ao do teste de tuberculinização intradérmica, que teve sensibilidade de 84% e especificidade de 84% (KANAUJIA et al., 2003). A elevação dos níveis de anticorpos no soro demora mais tempo para acontecer se comparado a resposta imune celular, que leva de 3 a 4 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 acontece em um a dois meses do 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 que a reatividade do teste de tuberculinização 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 em tuberculose, podendo-se utilizar em conjunto o ELISA ou outro teste sorológico com o teste de tuberculinização e assim aumentar a possibilidade de resultados mais confiáveis (LERCHE et al., 2007; LERCHE et al., 2008; MILLER, 2008).

Além do ELISA, vários outros testes estão sendo desenvolvidos para a detecção de anticorpos específicos contra as micobactérias e podem ser aplicados em programas de vigilância para tuberculose em primatas como o Western Blot (*Immunoblot*), MAPIA (*Multiantigen Print Immunoassay*), Prima –TB STAT-PAK (LERCHE et al., 2008; MCMANAMON, 2008; MILLER, 2008).

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

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, seguido 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 um resultado positivo. (MCMANAMON, 2008; MILLER, 2008). Pode ser utilizado também como um teste confirmatório para ELISA ou um 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® inunoensaio é um teste rápido de fluxo lateral, desenvolvido pela Chembio Diagnostic Systems, para o sorodiagnóstico de tuberculose em primatas, e licenciado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos para ser usado em macacos rhesus e cynomolgus, como também em outras espécies de primatas (LYASHCHENKO et al., 2007). É um teste de fácil execução e pode ser usado para analisar soro, plasma ou outro fluido corporal contendo anticorpo. Por isso ele acaba se tornando uma atrativa opção para institutos com muitas instalações (BUSHMITZ et al., 2008; LERCHE, 2007). Em uma

avaliação, onde três diferentes espécies foram experimentalmente infectadas com *M. tuberculosis*, a evolução sorológica demonstrou alta sensibilidade (90%) e especificidade (99%) (LYASHCHENKO et al., 2007).

Esse teste emprega uma seletiva ordem de antígenos protéicos recombinantes de *M. tuberculosis*, que ficam impregnados em uma única tira do teste, que possui uma banda de controle, e avalia a presença de anticorpos para estes antígenos nas amostras testadas. O resultado pode ser obtido em 20 minutos e requer um pequeno volume (aproximadamente 30 µl) de soro, plasma ou sangue total. O teste é montado sobre um suporte plástico, sendo semelhante na aparência com um teste de gravidez para humanos (Figura 11). A combinação do teste Prima TB STAT-PAK® e do teste de tuberculinização intradérmico parece ser uma sensível e confiável abordagem diagnóstica para a detecção de tuberculose em primatas (LERCHE, 2007; BUSHMITZ et al., 2008).

Figura 11 - Teste Prima TB STAT-PAK®. A figura da esquerda representa resultado negativo e a figura da direita, resultado positivo; na janela do teste, a linha mais acima presente em ambos é a banda controle; a linha mais abaixo marcada por uma seta é a banda que indica resultado positivo.

Fonte: (LYASHCHENKO et al., 2007)

Como os testes baseados na detecção de anticorpos dão resultados positivos ao longo de toda a evolução da doença, enquanto que os testes baseados na resposta imune mediada por células são apenas positivos durante um período, é indicado usar ambos os testes 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 se detectar animais positivos e assim melhorar significativamente a eficiência dos programas de sanidade animal.

6.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRETO

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

6.2.1 Métodos de coloração em lâminas e Cultura bacteriana

A parede celular das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* contém ácido micólico, permitindo que essas bactérias sejam tingidas com corantes básicos, o que lhes confere a característica álcool-ácido resistente, mas a presença de bacilos álcool-ácido resistentes sobre um esfregaço não é conclusivo. (FROST, 2006).

Há três métodos de coloração para rápida detecção e confirmação de bacilos álcool-ácido resistentes: o método fluorocromo de Truant, com corantes fluorescentes auramina-rodamina; e os métodos de Ziehl-Neelsen (Figura 12) e Kinyoun, com carbofucsina (FROST, 2006; BRUSHMITZ et al., 2008; MILLER, 2008, MURRAY et al., 2009).

Figura 12 - Células gigantes multinucleadas com bacilos álcool-ácido resistentes (setas), coloração Ziehl-Neelsen, em tecido pulmonar de macaco rhesus infectado com *M. tuberculosis*.

Fonte: (LEWINSOHN et al., 2006)

As amostras são examinadas ao microscópio óptico ou, se corantes fluorescentes forem usados, ao microscópio fluorescente. A coloração álcool-ácido resistente é um método fácil e rápido, mas ela tem sua limitação, pois existem outras espécies de bactérias que também possuem essa característica, como a *Nocardia*. Portanto, outros métodos de diagnóstico devem ser utilizados para se conseguir a identificação do agente, como a cultura bacteriana (FROST, 2006; BRUSHMITZ et al., 2008; MILLER, 2008; MURRAY et al., 2009).

O cultivo e isolamento com sucesso das micobactérias dependem da qualidade da amostra, de um processamento adequado e das técnicas empregadas pelo laboratório (FROST, 2006). Dos testes de diagnóstico para tuberculose, o cultivo e isolamento ainda são considerados o “*gold standard*”, porém é o mais demorado para se obter o resultado, pois as bactérias do Complexo *M. Tuberculosis* são muito exigentes nutricionalmente, crescendo lentamente e dividindo-se a cada 12 a 24 horas, podendo o período de incubação levar de 3 a 8 semanas a 37°C para se obter o isolamento (MURRAY et al.¹⁸, 1998 apud KANEENE; THOEN, 2004, p. 686; MILLER, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Culturas provenientes de amostras de animais com doença em estágio inicial geralmente apresentam nenhum crescimento (FROST, 2006).

Os meios de cultura precisam ter uma fonte de carbono, uma de nitrogênio, elementos inorgânicos e o verde de malaquita, para inibir contaminantes (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Embora *M. bovis* e *M. tuberculosis* sejam similares clinicamente, suas culturas são diferentes (FROST, 2006). *M. bovis* tem baixo ou nenhum crescimento em meio contendo mais do que 1% de glicerol, diferente do *M. tuberculosis*, por isso é utilizado para seu isolamento o meio de cultura Stonebrink, que é constituído por piruvato de sódio ao invés de glicerol, e recomenda-se também a utilização de pequena concentração de CO₂ (menos que 5%), devido a sua microaerofilia. Outra característica distinta é que *M. bovis* não reduz nitrato e o teste para niacina é negativo. Para as outras micobactérias do Complexo *M. Tuberculosis* os meios mais utilizados são o Löwenstein-Jensen, a base de ovo, e o Middlebrook, a base de ágar (ABRAHÃO, 1998; FROST, 2006).

Para a realização do esfregaço e da cultura pode-se usar como amostras: secreções nasais, swab de garganta, lavagem gástrica, lavagem traqueal ou broncoalveolar, amostra fecal e amostras de órgãos com lesões sugestivas (CORCORAN; THOEN, 1991; BRUSHMITZ et al., 2008; MILLER, 2008). No lavado gástrico, para uma amostragem

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.

relevante, a técnica deve ser realizada logo na parte da manhã, após o ciclo noturno, pois durante o sono os animais tendem a engolir 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, sendo logo em seguida adicionado um *buffer* neutralizante para otimizar a viabilidade das micobactérias para a cultura (LIN et al., 2008).

As amostras devem ser cuidadosamente coletadas e manuseadas, levando-se em conta o potencial de transmissão (FROST, 2006).

6.2.2 Técnicas moleculares

Os métodos moleculares de diagnóstico representam um grande avanço na epidemiologia da tuberculose no meio veterinário, pois podem proporcionar importantes conquistas em sensibilidade, especificidade e capacidade de revelar quantidades muito pequenas de bacilos, mesmo que estejam mortos e em um curto espaço de tempo. Além disso, permitem o rastreamento das fontes de infecção pela comparação das características moleculares das estirpes isoladas. Entretanto, ainda estão restritos a um pequeno número de laboratórios especializados (ZANINI et al., 2001).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) pode ser usada para detectar DNA dos bacilos da tuberculose em amostras de fezes, secreções respiratórias, lavado gástrico, lavado traqueal ou broncoalveolar, tecidos e em amostras colhidas *post-mortem*, incluindo tecidos fixados com formalina, e tem a vantagem de ser mais rápida do que métodos convencionais de cultura bacteriana para o diagnóstico, permitindo a identificação da espécie e distinguindo-as das micobactérias não tuberculosas, que podem gerar uma reação falso-positiva no teste de tuberculinização (CORCORAN; THOEN, 1991; BRUSHMITZ et al., 2008; MILLER, 2008). Atualmente existem vários genes do DNA micobacteriano conhecidos e utilizados para a detecção das micobactérias através do PCR, como fragmentos do gene Mtp40, que está presente no DNA de *M. tuberculosis*, o antígeno Alpha e o gene RpoB (GORDON et al., 1999; LEE et al., 2000).

Recentemente várias técnicas moleculares que conseguem fazer a identificação das cepas das micobactérias e que já são usadas para a confirmação da tuberculose em humanos e no bovino, estão sendo desenvolvidas e aprimoradas para poder ser aplicadas no diagnóstico de tuberculose em primatas não humanos, como o Spoligotyping (KAMERBEEK et al.,

1997), o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (VAN EMBDEN et al., 1993; HARRIS, 2006), PCR-PRA (*Polymerase Chain Reaction-PCR Restriction Analysis*) (TELENTI et al., 1993), MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) (SUPPLY et al., 2000).

O RFLP é uma técnica que permite a detecção e a tipagem de *M. tuberculosis*, avaliando a presença da sequência de inserção IS6110 pela detecção do polimorfismo dos fragmentos de restrição. Essa técnica é considerada o “gold standard” dentre as técnicas de diferenciação de cepas, mas atualmente vem sendo substituídas por técnicas mais simples e mais fáceis de serem realizadas (VAN EMBDEN et al., 1993).

O Spoligotyping é um método que tem a vantagem da não necessidade de se esperar o crescimento das micobactérias em meio de cultura e é um método mais simples em comparação ao RFLP, permitindo simultaneamente a detecção e a tipificação das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* e *M. bovis*) com o resultado em 1 ou 2 dias, o que antes precisaria de um ou mais meses desde a suspeita da doença até a tipificação da micobactéria. Esse método baseia-se na amplificação pelo PCR do DNA presente no locus denominado de região de repetição direta DR (*Direct Repeat*). Essa região está presente exclusivamente no genoma das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*. O spoligotyping pode não apenas ser usado para a diferenciação das cepas de *M. bovis*, mas também pode distinguir estas do *M. tuberculosis*, o que é difícil e demorado de se conseguir fazendo somente as técnicas convencionais de bacteriologia, além de também fazer a tipificação do *M. tuberculosis*. Uma série de amostras clínicas pode ser utilizada para a realização do teste, como lavados gástricos e broncotraqueal, secreções, fezes, entre outros. Ele também consegue detectar e tipificar micobactéria presente em tecidos parafinados e em lâminas coradas através do Ziehl-Neelsen (KAMERBEEK et al., 1997).

O PCR-PRA é um método rápido usado para a identificação das micobactérias, que se baseia na avaliação do gene que codifica a proteína 65-kDa, através do uso de enzimas de restrição que fazem a digestão dos produtos amplificados pelo PCR usando *primers* comuns a todas as micobactérias (TELENTI et al., 1993).

O MIRU são locus encontradas dentro do genoma das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* que contém uma sequência repetida de pares de bases em minissatélites e são similares as sequências descritas no genoma humano e de animais, denominadas de locus VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*). Os MIRUs estão dispersos em regiões intergênicas do genoma do Complexo *M. tuberculosis* e possuem de 40 a 100pb. (SUPPLY et al., 1997; SUPPLY et al., 2000). Ele se baseia na análise dos produtos amplificados que são

separados em gel de agarose, permitindo verificar o tamanho dos fragmentos amplificados e a quantidade de repetições dos locus. Dessa forma consegue-se fazer a identificação das micobactérias presentes na amostra analisada (SUPPLY et al., 1997; SUPPLY et al., 2000; BARNES; CAVE, 2003).

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 coletados amostras de lavado bronquial, lavado gástrico e sangue desses animais. Essas amostras foram processadas, colocadas em meios de cultura e foram submetidas à coloração e usadas para o PCR e RFLP. Dos 68 animais, 5 foram positivos para *M. tuberculosis*, através da amplificação do Mtp40 e do antígeno alpha, 3 dos 5 tiveram cultura positiva para *M. tuberculosis* e 2 tiveram coloração positiva para bactérias álcool-ácido resistente. Nenhum dos animais positivos apresentava sinais da doença (ALFONSO et al., 2004).

Apesar da importância destes testes confirmatórios, eles ainda não estão sendo utilizados em larga escala na rotina de vigilância das instituições mantedoras de primatas (LERCHE et al., 2008), mas alguns laboratórios de diagnóstico já os utilizam. Eles permitem que o resultado seja obtido em um espaço de tempo relativamente curto e, principalmente, ajudam na detecção de animais positivos. A combinação dos testes moleculares com o cultivo bacteriano são ferramentas essenciais atualmente para se conseguir o isolamento e identificação das cepas das micobactérias.

7 EXAMES RADIOGRÁFICOS

A radiografia do tórax é um método de diagnóstico que auxilia na detecção de anormalidades, que podem ser indicativos 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 que tem teste de tuberculinização negativo por causa da imunossupressão associada com a doença fulminante. As lesões nos pulmões variam de tamanho, formato, densidade e cavitação, onde grandes granulomas ou áreas com cavitação geralmente são visualizadas radiograficamente. Devido à rara calcificação nos granulomas em primatas, a imagem radiográfica dessas formações frequentemente aparece menos evidenciada se comparado a outros animais e aos 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 et al., 2006; BRUSHMITZ et al., 2008).

A radiografia e o ultra-som abdominal 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 no organismo animal, dando detalhes da evolução da doença em tempo real (CORCORAN; THOEN, 1991; FROST, 2006; LEWINSOHN et al., 2006; BRUSHMITZ et al., 2008).

8 NECROPSIA E ACHADOS MICROSCÓPICOS

As lesões características da tuberculose frequentemente só são detectadas no exame *post-mortem*. Os órgãos principalmente afetados são os pulmões (Figura 13) e linfonodos adjacentes e os tecidos linfáticos associados ao trato gastrointestinal, dependendo da porta de entrada da infecção. Secundariamente ocorre disseminação para o baço, fígado, rim e tecidos linfáticos associados. Outros locais como ovário, cérebro, coluna espinhal, linfonodos periféricos, pele e glândula mamária podem também apresentar granulomas, mas são observados em menor frequência (RENQUIST; WHITNEY, 1978; KING, 1993; CAPUANO et al., 2003; ISAZA, 2003; KANEENE; THOEN, 2004; FLYNN, 2006; FROST, 2006).

Figura 13 - 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 podem ter 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. Os linfonodos que drenam a região afetada também são encontrados nódulos caseosos. Em áreas onde o pulmão afetado está em associação com a pleura parietal, podem ocorrer aderências, assim como em outros tecidos comprometidos e as serosas adjacentes, tais como o mediastino, peritônio e mesentério. As lesões encontradas são recolhidas, fixadas em formol ou “in natura”, e enviadas para exames laboratoriais, para isolamento e identificação

bacteriana através de cultura em meio sintético e testes moleculares (KING, 1993; ISAZA, 2003; FROST, 2006).

Na necropsia, a tuberculose deve ser diferenciada de outras doenças granulomatosas, como as causadas por corpos estranhos (por exemplo, granulomas decorrentes da administração de caulim), micoses, protozoários e parasitas, como as norcadioses, *Pneumonyssus simicola*, *Hepatocystis kochi* e oesofagostomias. As lesões causadas por esses parasitas são facilmente distinguíveis microscopicamente das lesões por micobactérias. Além disso, as lesões produzidas pela *Nocardia* possuem predominância de neutrófilos e são purulentas ou piogranulomatosas diferente do que é observado em um típico granuloma tuberculoso (KING, 1993)

Os achados microscópicos em animais com tuberculose pode variar de acordo com a duração e extensão da doença. Nos estágios iniciais podem ser encontrados alguns e dispersos granulomas microscópicos, constituídos de células epitelióides e ocasionalmente células de Langhans, podendo existir uma coleção de neutrófilos no centro de alguns microgranulomas. A coloração Ziehl-Neelsen pode revelar apenas uma rara quantidade de bacilos álcool- ácido resistente no interior das células epitelióides. Inicialmente, essas lesões estão restritas aos pulmões ou ao trato gastrointestinal, que são as duas maiores portas de entrada do bacilo da tuberculose. Nesse estágio, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com *Nocardia* spp., que é um bacilo álcool-ácido resistente e onde nas lesões se encontra uma predominância de neutrófilos, assemelhando-se a infecção recente por micobactéria. 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 epitelióides e células gigantes de Langhans, sendo que algumas vezes a porção central pode estar parcialmente calcificada, o que não é muito frequente nos primatas. A periferia do granuloma é geralmente constituída por certa quantidade de tecido fibroso e infiltrado de linfócitos. (KING, 1993; FROST, 2006).

9 TRATAMENTO

Terapias com antibióticos em animais doentes não são recomendáveis, principalmente devido ao aumento de cepas resistentes a várias drogas, além disso, pessoas com contato prolongado com um animal tuberculoso possuem maior risco de infectar-se com uma micobactéria resistente. Por isso é recomendada a eutanásia de animais positivos ou com dois resultados inconclusivos do testes de tuberculina (JOHNSON-DELANEY, 1994; FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2008).

Alguns autores sugerem o tratamento de animais de grande valor zootécnico ou que corram o risco de extinção. Entretanto, o custo do tratamento é alto e existem as questões de segurança, que devem ser seguidas rigidamente, devido ao risco de transmissão da doença para aqueles que irão manipular o animal, para os outros animais da coleção e para o público visitante. Portanto medidas de infra-estrutura, 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 (WOLF et al., 1988; WARD et al., 1985; JOHNSON-DELANEY, 1994; BUSHMITZ et al., 2008).

Quando for plausível a opção pelo tratamento, devem ser administradas múltiplas drogas, como por exemplo, a combinação de isoniazida e estreptomicina, de isoniazida e ácido p-aminosalicílico ou então 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 6 a 12 meses e seguida sem nenhum interrompimento. O tratamento pode resultar na diminuição da resposta para o teste de tuberculinização, pois a isoniazida é imunossupressora, por isso é aconselhável a realização do mesmo um mês após a interrupção do tratamento (WOLF et al., 1988; WARD et al., 1985; JOHNSON-DELANEY, 1994; BUSHMITZ et al., 2008).

10 PREVENÇÃO E CONTROLE

Programas de prevenção, vigilância e monitoramento são essenciais dentro das instituições mantedoras de primatas em cativeiro. O principal objetivo é reduzir a probabilidade de exposição desses animais às micobactérias, através do conhecimento da epidemiologia da doença, da aplicação de uma série de medidas de biossegurança e de uma rotina de testes (FROST, 2006; KANEENE; THOEN, 2004). As medidas de biossegurança são um conjunto de normas operacionais rígidas, que devem ser seguidas por todos nas instituições, sendo seus principais itens: quarentena e vazão sanitário; limpeza e desinfecção de utensílios e do ambiente; controle e armazenamento adequado dos alimentos oferecidos aos animais; controle de animais sinantrópicos; controle parasitário; destino adequado de lixo, excretas e carcaças; e a erradicação de doenças (CUBAS 2008; SILVA; CORREA, 2007; OIE, 2011). Assim consegue-se fazer um monitoramento dos animais, detectando qualquer alteração que possa indicar a presença da doença no local (FROST, 2006; KANEENE; THOEN, 2004).

10.1 AQUISIÇÃO DE NOVOS ANIMAIS

Antes da aquisição de novos animais, medidas preventivas devem ser estabelecidas no local para se evitar a introdução da tuberculose na colônia sadia, como a aplicação de testes de diagnósticos, cuidados com os fornecedores, quarentena, práticas de manejo adequadas, monitoramento dos animais e cuidado com a saúde da equipe (UNE; MORI, 2007; BUSHMITZ et al., 2008).

O risco de carrear patógenos causadores de zoonoses está relacionado à posição taxonômica e a região de origem das espécies em questão. Pode-se considerar que esse risco aumenta na seguinte ordem: prosímios, callitrichídeos, 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, 2011).

Segundo o Código Sanitário para Animais Terrestres da OIE (World Organisation for Animal Health) (2011) as autoridades veterinárias dos países importadores devem requerer para todos os primatas:

- A apresentação de um certificado veterinário internacional atestando que os animais foram individualmente identificados (os meios de identificação devem ser descritos no certificado), que foram examinados no dia do embarque e considerados saudáveis, livres de sinais clínicos de doenças contagiosas, em condições adequadas para serem transportados e os comprovantes de que os animais nasceram no local de origem ou foram mantidos nesse local por no mínimo dois anos;
- Que são originários de instalações sob supervisão veterinária permanente, e onde é seguido um programa adequado de monitoramento de saúde, incluindo a execução de exames microbiológicos e parasitológicos, assim como necropsias;
- Que comprove que nenhum caso de tuberculose tenha ocorrido em 2 anos antes do embarque no local ou no recinto de onde o animal é proveniente;
- Deve ser anexado ao certificado veterinário internacional todo o histórico do animal, incluindo todas as vacinações, exames e tratamentos feitos antes do embarque;
- 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 feito por outras vias (ferrovia ou rodovia);
- Todos os animais que vierem a óbito por qualquer razão devem ser submetidos a exame *post-mortem* em um laboratório de referência; e qualquer causa de doença ou morte deve ser esclarecida antes do grupo ao qual o animal pertencia ser liberado da quarentena (OIE, 2011).

A realização de testes de tuberculinização antes do transporte dos animais oriundos de criadores com controle veterinário é recomendável, assim diminuirá o risco de importação de primatas com a doença e reduzirá o requerimento de testes durante a quarentena (BUSHMITZ et al., 2008). A OIE (2011) recomenda que eles sejam submetidos, nos 30 dias anteriores ao embarque, ao exame para tuberculose, em duas ocasiões, com um intervalo mínimo de duas semanas entre cada teste.

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

- 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 IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis)

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 manter como animais de estimação. Esses animais devem possuir sistema de marcação 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) emitido pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1997).

- Portaria nº93, de 07 de julho de 1998, normaliza 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 a autorização do MAPA, que se manifestará quanto às questões zoonosológicas e os estabelecimentos registrados no IBAMA como importadores devem possuir um quarentenário aprovado pelo MAPA. Os animais vivos somente poderão ingressar no país se marcados na origem utilizando sistema de marcação 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 marcados na origem e mediante a apresentação de certificado que comprove a 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 marcados 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 marcação individual dos exemplares e apresentação da licença de exportação do país de origem (BRASIL, 1998)

- Decreto nº 3607, 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 II da CITES sujeito as 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 existe normas e medidas que regulamentem a aplicação tanto da quarentena primária, que deve ser realizada após a importação do animal, quanto da quarentena secundária ou doméstica, que deve ser aplicada quando ocorre a movimentação de animais entre instituições dentro do país.

10.2 QUARENTENA

A aplicação dos procedimentos de quarentena no momento em que o animal chega ao país ou a uma nova instituição é indispensável para poder avaliar a 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., 2008; OIE, 2011).

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 quando o último animal entra no recinto. Os animais de mesma origem deverão estar agrupados no transporte e não misturados com outras espécies, e um 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 fator 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 a tuberculose (BUSHMITZ et al., 2008; OIE).

Para minimizar o risco de contaminação, a movimentação de animais durante a quarentena deverá ser evitada, a não ser que haja permissão veterinária e ainda assim, depois de formado o novo grupo, deve-se recomençar a contagem do período (BUSHMITZ et al., 2008; OIE, 2011).

Em colônias já estabilizadas recomenda-se evitar a entrada de novos animais, mas nem sempre isso é possível. Algumas vezes as instituições recebem pedidos para aceitarem primatas que eram criados como animais de estimação. Esses locais devem analisar as

condições de espaço, a situação financeira e o efeito sobre a população existente, permanecendo o animal em quarentena, pois muitas vezes não se sabe sua origem, nem seu histórico de saúde (FROST, 2006).

A completa separação física dos grupos é importante para se evitar a exposição e a introdução de agentes infecciosos de um grupo para outro durante esse período. (FROST, 2006; OIE, 2011). 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., 2008). Segundo a OIE (2011) as salas ou recintos devem ser projetados para permitir uma manutenção segura dos animais e uma limpeza e descontaminação fácil e eficiente, descritos a seguir:

- As paredes, tetos e chão devem ser resistentes a água para facilitar a limpeza e a desinfecção e durante esses procedimentos deve-se tomar cuidado para 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 devidamente lacrados e transportados para o local onde serão descontaminados quimicamente ou fisicamente ou incinerados;
- Quando existirem janelas nos recintos, essas devem ser fechadas e seladas, a menos que o local esteja suficientemente separado, através da distância, cercas e outros meios de separação, da área de não-quarentena;
- O sistema de ventilação, no caso de salas, deve ser operado e monitorado de maneira a assegurar o isolamento dos animais, enquanto que também permite conforto e saúde dos mesmos. O ar de exaustão ou re-circulante deve ser filtrado e eliminado longe dos edifícios e de outras áreas ocupadas. Sistemas de aquecimento, ventilação e ar-condicionado devem ser projetados para que sua operação possa ser contínua, mesmo em capacidade reduzida em eventual falha elétrica ou falha em algum outro sistema de suporte.

A área de quarentena deve conter no mínimo duas pequenas salas, separadas fisicamente, para a preparação do pessoal que cuida desse local, sendo uma destinada a troca de roupa, calçados e artigos de proteção individual e a outra onde se encontram os armários e as pias para lavagem das mãos, e se possível também os chuveiros para tomar banho depois do contato com os animais. Os calçados devem ser lavados ao sair de cada recinto e das instalações da quarentena ou trocados. Essas medidas previnem que ocorra uma contaminação das roupas e calçados usados fora da área de quarentena e também previne o transporte de

possíveis patógenos de um recinto para outro dentro das instalações. Equipamentos adequados 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, 2011). 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 (2011) recomenda que existam medidas de controle para o acesso do quarentenário e que na entrada dessa área seja colocada uma placa de aviso de perigo avisando 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 conseguir detectar qualquer alteração nos animais, realizar a remoção de resíduos de forma segura, realizar o recolhimento de amostras, a aplicação de testes de diagnóstico e sua interpretação (BUSHMITZ et al., 2008; FROST, 2006; OIE, 2011).

Como é preciso no mínimo três semanas após a infecção para que o animal desenvolva uma reação de hipersensibilidade tardia, uma série de consecutivos testes é recomendada durante o período de quarentena para aumentar a possibilidade de detectar animais positivos recém adquiridos e também de aumentar a possibilidade de detectar animais que estejam com a infecção latente e, que durante a quarentena, se torne ativa. A duração da quarentena deve ser de no mínimo 42 dias com três testes de tuberculinização 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 eles se recuperem do estresse do transporte e se adaptem ao novo ambiente. Assim eles podem ser anestesiados com segurança para a aplicação da tuberculina e também para o exame físico (CDC, 1993; BUSHMITZ et al., 2008; ROBERTS; ANDREWS, 2008). 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. Ele deverá ser monitorado periodicamente e aqueles que tiverem uma perda de mais do que 10% de seu peso corporal ou animais jovens que não ganharam peso depois de 42 dias deverão ser examinados e cuidadosamente avaliados (BUSHMITZ et al., 2008).

A duração mínima da quarentena pode ser prolongada até que todos os eventos que ocorreram durante esse período sejam investigados e resolvidos, e que não exista mais nenhuma evidência de transmissão de agentes infecciosos dentro do grupo (OIE, 2011). O

histórico e a documentação disponível sobre a saúde do animal também pode influenciar na duração e extensão do período de quarentena. Como regra, quanto menos informação disponível, mais longa e rigorosa será a quarentena (FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2008).

Animais originários da natureza e mantidos em cativeiro por um período antes da exportação são potenciais fontes transmissoras de doença, sendo que normalmente apenas uma quantidade muito limitada de informações sanitárias pode ser dada pelo fornecedor e pela autoridade veterinária do país exportador (OIE, 2011). Nesses casos antes da exportação dos animais três testes negativos no intervalo de 2 semanas, com o último teste não mais do que 10 dias antes do embarque são 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 tem relatado doença ou significativa perda de animais não deveriam ser aceitos pelo importador (BUSHMITZ et al., 2008). Após a chegada do animal no local de destino, recomenda-se a colocação imediata destes em uma estação de quarentena por no mínimo 12 semanas, e durante esse período eles devem ser monitorados diariamente para sinais de doenças e, se necessário, submetidos a exame clínico. Em prosímios, macacos do “novo mundo”, macacos do “velho mundo”, gibões e grandes primatas o teste de tuberculinização deve ser feito no mínimo três vezes em intervalos de 2 a 4 semanas e em saguis e micos o teste deve ser realizado duas vezes em um intervalo de 2 a 4 semanas. Os animais que vierem a óbito, seja qual for a causa, devem ser submetidos a exame *post-mortem* e as causas devem ser esclarecidas antes do grupo, ao qual o animal pertencia, ser liberado da quarentena. (OIE, 2011).

Segundo a OIE (2011) é necessário que o fornecedor comprove que os animais foram mantidos em locais e recintos nos quais nenhum caso de tuberculose ocorreu nos 2 anos anteriores ao embarque. Em caso de haver algum registro da infecção na origem no último ano, o período de quarentena deve ser prolongado para 60 dias incluindo dois adicionais testes de tuberculinização. 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, enquanto que para os outros animais as medidas de quarentena serão reiniciadas daquele ponto (BUSHMITZ et al., 2008).

Antes da liberação dos animais da quarentena, todas as informações pertinentes ao grupo deverão ser analisadas, incluindo os documentos de transporte, certificados de saúde e 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 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., 2008).

Animais, que morrerem durante a quarentena, devem ser manipulados com cautela. Eles deverão ser cuidadosamente ensacados, pesados e submetidos à necropsia em local apropriado. O veterinário patologista e o responsável pela área de quarentena deverão ser notificados imediatamente. As amostras com lesões suspeitas devem ser encaminhadas ao laboratório, fixadas em formol ou refrigeradas, para cultivo bacteriano e testes moleculares. Os animais do mesmo grupo permanecerão isolados até que a causa da morte seja identificada (BUSHMITZ et al., 2008; OIE, 2011).

Após a retirada dos animais da quarentena os recintos e os equipamentos, como comedouro e bebedouro, devem ser limpos e descontaminados (OIE, 2011).

10.3 ROTINA DE TESTES PÓS-QUARENTENA

A aplicação dos testes de tuberculinização nos primatas é recomendada durante o período pós-quarentena, principalmente em instituições onde humanos possuem contato próximo com eles. Para babuínos, prosímios e macacos do “novo mundo” os testes devem ser aplicados semestralmente; para grandes primatas anualmente e os outros macacos, trimestralmente. Um local com pouca exposição dos animais aos humanos pode ter uma rotina de testes com intervalo de 12 meses, dependendo da política da instituição. No caso de animais provenientes de instituição com menor frequência de testes para tuberculose do que o aconselhável, o veterinário responsável da instituição de destino deve ser notificado (CDC, 1993; BUSHMITZ et al., 2008).

Após a tuberculinização se ocorrer resultados inconclusivos ou suspeitos, o animal tem que ser levado para a área de quarentena e todos aqueles pertencentes ao mesmo grupo, deverão ser considerados como possivelmente infectados e, portanto devem ser 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 seu corpo levado ao patologista para 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, sendo realizados cinco testes de tuberculinização, onde os

animais são testados a cada duas semanas até que se tenha completado os cinco testes sem nenhuma reação, podendo finalizar a quarentena. O primeiro teste deve ser administrado duas semanas depois da identificação do animal positivo ou do resultado inespecífico ou suspeito (CDC, 1993; BUSHMITZ et al., 2008).

É necessário que a instituição tenha um programa de registro de todos os animais existentes no local, contendo seu histórico e rotina de manejo, assim em um eventual surto é possível traçar o caminho epidemiológico, identificando potenciais fontes de transmissão e a possibilidade de outras instituições estarem envolvidas (FROST, 2006).

10.4 ESTRUTURA, LIMPEZA E DESINFECÇÃO DOS RECINTOS

A limpeza e desinfecção dos recintos e equipamentos são procedimentos importantes dentro dos programas de sanidade animal, pois ajudam a prevenir a multiplicação e disseminação do bacilo da tuberculose dentro das instituições mantedoras de animais selvagens. Os desinfetantes micobactericidas podem ser usados em instituições que abrigam primatas não humanos (BUSHMITZ et al., 2008), levando-se sempre em conta que as micobactérias são muito resistentes a desinfetantes, sendo necessário conhecer a ação do produto (OIE, 2011). É recomendado também que periodicamente ocorra um rodízio no uso dos desinfetantes para se evitar o desenvolvimento de resistência. Uma equipe treinada é essencial para a realização dessas ações de limpeza e desinfecção (WHO, 1984).

A limpeza deve ser realizada primeira, com a remoção do material orgânico e de outras partículas, que devem ser levadas para um local adequado para a sua desinfecção e descarte, assim ajudando na ação dos produtos desinfetantes (WHO, 1984). A limpeza pode ser feita com o uso de detergentes como o fosfato trisódio ou carbonato de sódio, de preferência com água quente para o enxágue, evitando-se deixar resíduos que podem interferir na ação dos desinfetantes. Deve-se sempre tomar o cuidado para diminuir a formação de aerossóis durante esse procedimento (WHO, 1984).

Os desinfetantes com ação micobactericida recomendados são os compostos fenólicos, o ácido peracético, os alcoóis, os derivados de aldeídos, compostos iodados e compostos clorados (RUBIN, 1983; AYLIFFE et al., 1993; ASCENZI, 1996; RUSSELL, 1996; RUTALA; WEBER, 2004). Existem diversos trabalhos a respeito da ação dos desinfetantes sobre micobactérias e pode-se observar que a eficiência destes é influenciada por diversos

fatores como: a concentração, o ph, 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 (SPAULDING et al., 1977; PRINDLE, 1983). 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 tem sua atividade micobactericida alterada (WHO, 1984). Os compostos clorados, dentre eles o hipoclorito de sódio, tem sua atividade micobactericida discutida por diversos autores, sendo que alguns não recomendam sua utilização, pois sua eficiência depende de vários fatores como 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 e de fixar matéria orgânica (MINER et al., 1977; RUSSEL, 1982; RUTALA; WEBER, 2004). O ácido peracético possui ampla atividade micobactericida, mesmo na presença de material orgânico, são hidro e lipossolúveis e quando decomposto gera produtos não tóxicos (ácido acético, água e oxigênio), sendo vantajoso para o meio ambiente, mas possui alta ação corrosiva, sendo incompatíveis com materiais que contenham ferro, cobre e zinco e é um produto mais caro. Atualmente já existem comercialmente formulações de misturas de ácido peracético, com ácido acético e peróxido de hidrogênio, que não são corrosivas e possuem grande ação micobactericida (HOLTON et al., 1995; RUTALA; WEBER, 2004).

Muitas instituições, com o objetivo de manter as necessidades sociais dos primatas, têm mantido várias espécies juntas, o que não é recomendado, pois potencializa a chance de transmissão de doenças que em algumas espécies não causam tantos danos e em outras os indivíduos são mais vulneráveis. Tendo em vista este problema, muitas estão utilizando desinfetantes com ação microbicida durante a rotina de lavagem dos recintos, na tentativa de reduzir a carga de contaminação ambiental e de minimizar a formação de aerossóis. (FROST, 2006).

Os métodos físicos de descontaminação podem também ser usados. No caso das micobactérias o calor é bastante eficaz, sendo que acima de 60°C elas já são destruídas. Nas instituições mantedoras de primatas não humanos esse método, como a autoclavagem, pode ser usado para a desinfecção de material orgânico (fezes, tecidos corporais) e equipamentos.

As micobactérias também são sensíveis a luz ultravioleta, sendo esse método recomendado para ser usado na descontaminação de superfícies, pois seu poder de penetração em materiais sólidos é reduzido (WHO, 1984).

Os locais, onde animais positivos e/ou suspeitos foram identificados, devem ser interditados e submetidos a rigoroso processo de desinfecção. As instalações e equipamentos, incluindo os bebedouros e comedouros, devem ser limpos e desinfetados em intervalos semanais por pelo menos três vezes. As micobactérias são muito resistentes as condições ambientais favoráveis, como alta umidade e baixa incidência de luz solar, podendo permanecer no local por longos períodos (WHO, 1984; KING, 1993).

Um recinto planejado, levando-se em consideração os aspectos sanitários, reduz muito a concentração de agentes etiológicos e favorece o manejo dos animais. A limpeza e desinfecção das instalações nos zoológicos brasileiros normalmente são realizadas em uma frequência adequada, mas para que o resultado seja eficiente, os funcionários devem estar sob permanente supervisão e treinamento (CUBAS, 2008). Qualquer manipulação ou procedimento realizado deve ser feito cuidadosamente para minimizar a produção de aerossóis nos recintos (BUSHMITZ et al., 2008).

Em instituições abertas a visitação pública, algumas medidas estruturais devem ser adotadas, com a finalidade de diminuir a possibilidade de transmissão de infecções devido ao contato com os humanos visitantes e também impede que objetos e alimentos contaminados sejam arremessados para dentro dos recintos, com a implantação de barreiras físicas, tais como vidro ou fosso (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; FROST, 2006). Na década de 30 a introdução de barreiras de vidros nos recintos dos primatas em alguns zoológicos na Europa e nos Estados Unidos, reduziu a incidência da tuberculose nesses animais (RUCH¹⁹, 1959 apud MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001, p. 291).

Os recintos devem ser construídos de maneira que se evite a contaminação da água e da comida com as fezes. Os locais onde são colocados devem ser limpos diariamente, assim como os recintos. Cada recinto deve ter seus equipamentos e utensílios, não devendo ser trocados de local e assim que terminado os procedimentos de limpeza e desinfecção, estes também devem ser limpos e desinfetados e guardados em local apropriado. Os alimentos devem ser submetidos rotineiramente a inspeção para verificar a qualidade e a procedência, assim como o local de preparo, que deve estar limpo e desinfetado, o acesso ao setor deve ser

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

restrito e cada grupo de animais deve ter seus próprios utensílios. Não se devem reaproveitar restos de alimentos e carcaças de animais sem procedência, como animais atropelados, pois o risco de introdução de doenças na instituição é alto (HOOP, 1997; CUBAS, 2008).

Carcaças, fluidos corpóreos, fezes e tecidos devem ser descartados de modo a não afetar a saúde pública, sendo recomendada a descontaminação desses materiais orgânicos antes da eliminação (OIE, 2011). No Brasil, apesar de uma legislação ambiental defasada e sem uma fiscalização adequada, alguns projetos estão sendo implantados em vários zoológicos brasileiros, como a construção de compostagens, rede de esgoto para cada recinto, estações de tratamento de água e de esgoto, sistema de drenagem e o reaproveitamento de águas pluviais são alguns exemplos. Outro exemplo é a instalação de filtros biológicos que podem ser instalados nos recintos com tanques de água, com um custo relativamente baixo, melhorando a qualidade da água e também o aspecto geral do ambiente para o público visitante (CUBAS, 2008).

10.5 PROGRAMAS DE SAÚDE DOS FUNCIONÁRIOS

O potencial de transmissão de várias doenças, inclusive a tuberculose, entre humanos e primatas existe, portanto as instituições devem desenvolver, implantar e aplicar programas de saúde para os funcionários personalizados, com continua revisão e avaliação da sua eficácia (FROST, 2006; OIE, 2011).

Um programa de prevenção de doenças deve incluir procedimentos operacionais padronizados, conhecimento sobre as doenças, a forma de transmissão e a importância da utilização de equipamentos de proteção individual, além de um programa de saúde ocupacional, para cuidar da saúde dos funcionários e de todas as pessoas que interagem diretamente com os animais dentro das instituições. Todos aqueles que vão entrar em contato com os animais deveriam receber treinamento, pois muitas vezes voluntários e estudantes acabam não recebendo treinamento, aumentando o risco de acidentes e de transmissão de doenças para ambos (FROST, 2006; SHIPLEY et al., 2008).

Algumas precauções devem ser seguidas pelo pessoal exposto aos primatas, principalmente com a manipulação de fluidos, fezes e tecidos. A presença de alguns agentes que causam zoonoses na maioria dos primatas é praticamente inevitável, mesmo após a liberação da quarentena (OIE, 2011). Cuidados devem ser tomados durante o manuseio destes

animais para se evitar arranhões, mordidas ou outros ferimentos. A contenção física deve ser feita apenas por pessoal qualificado e experiente e nunca deve ser feito somente por uma pessoa (OIE, 2011).

Por isso, deve-se garantir que os funcionários e todos aqueles que entram em contato com os animais sigam práticas de higiene e proteção individual, incluindo o uso de uniformes e de equipamentos básicos de proteção individual (máscara, luvas e protetor ocular) (Figura 14), e respeitem a proibição de beber, comer e fumar em áreas potencialmente infectantes (Figura 15) (CDC, 1993; BURGOS-RODRIGUEZ, 2011; OIE, 2011).

Figura 14. Equipamentos de proteção individual são importantes quando se trabalha com primatas não humanos.
Fonte: (BURGOS-RODRIGUEZ, 2011)

Figura 14. Placas de avisos devem ser visíveis para funcionários e visitantes.
Fonte: (BURGOS-RODRIGUEZ, 2011)

Todas as pessoas com contato rotineiro com esses animais, devem ser testadas para tuberculose antes da primeira exposição e depois testados anualmente (CDC, 1993; IALEGGIO, 1997). Outros autores recomendam que o teste intradérmico deva ser repetido a cada seis meses ou até quatro vezes por ano, dependendo da quantidade de primatas no local, podendo utilizar outros exames para a confirmação do diagnóstico. Em casos suspeitos as pessoas devem ser afastadas do contato com os animais até que o diagnóstico seja concluído e ela seja considerada livre da infecção, caso contrário deverá ser afastado do contato até o fim do tratamento (BURGOS-RODRIGUEZ, 2011; BUSHMITZ et al., 2008).

11 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.

Nos animais silvestres mantidos em cativeiro, e particularmente os primatas, são altamente suscetíveis à tuberculose, ocorrendo alta morbidade e mortalidade em surtos, gerando grandes perdas econômicas e risco para os humanos que possuem um estreito convívio com esses animais (UNE; MORI, 2007; BUSHMITZ et al., 2008; WHO, 2011).

A tuberculose em primatas não humanos mantidos em cativeiro, em muitos países, é rigidamente controlada, através de leis que regulamentam medidas sanitárias para o controle da doença. Embora existam 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: procedimentos para introdução de novos animais; testes de rotina específicos para tuberculose; estrutura dos recintos; capacitação e treinamento dos funcionários e controle periódico para tuberculose nos tratadores.

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 esse animal, como: analisar e conhecer o fornecedor, que deve fornecer certificados e documentos que comprovem que os animais estão saudáveis, com todo o histórico médico, comprovando que eles foram colocados em quarentena e testados para tuberculose antes do embarque. Ao chegarem à instituição de destino eles devem ser colocados imediatamente em isolamento, em uma área específica para esse procedimento. Durante o período de quarentena eles são avaliados clinicamente, monitorados e testados para tuberculose, sendo que animais positivos devem ser eutanasiados (OIE, 2011). Nos Estados Unidos os procedimentos de quarentena existem desde a década de 40, 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 regulamentou essas medidas tornando-as obrigatórias em todo o país. A quarentena é aplicada tanto em animais que são

importados, denominada de quarentena primária ou internacional, como também naqueles que são transferidos entre instituições dentro do país, denominada de quarentena secundária ou doméstica (ROBERTS; ANDREWS, 2008). Já no Brasil a ausência de instalações para quarentena é uma realidade em muitos zoológicos, sendo fundamental nessas situações que o médico veterinário cobre melhores condições para realizar corretamente a quarentena de animais (CUBAS, 2008).

O controle da tuberculose deve ser feito rotineiramente nos animais. Atualmente o teste de tuberculinização é o mais utilizado nas instituições para a vigilância e monitoramento da doença em primatas, aplicados periodicamente de acordo com a espécie e a quantidade de animais no local. A detecção da doença deve ser feita quanto mais cedo possível para se tentar reduzir as consequências causadas pelo surto, sendo importante no caso de primatas a detecção tanto da forma latente quanto da forma ativa da tuberculose. Animais com a forma latente não são infecciosos e podem ficar sem sinal clínico da doença por anos, mas uma eventual reativação pode resultar em transmissão secundária e assim se estabelecer 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 fator para o controle e prevenção da tuberculose nos primatas em cativeiro (LERCHE et al., 2008).

Apesar do teste de tuberculinização ser o mais usado atualmente nos programas de prevenção e vigilância, ele possui limitações, como a dificuldade de se detectar animais com infecção latente e aqueles que se tornaram anérgicos para antígenos micobacterianos, por causa da imunossupressão. Por isso, muitos pesquisadores estão tentando desenvolver e melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnósticos. Resultados promissores estão sendo obtidos quando da utilização combinada de testes que se baseiam na detecção da resposta mediada por células com testes que se baseiam na detecção da resposta imunológica humoral (BUSHMITZ et al., 2008; LERCHE et al., 2008). O aperfeiçoamento dos testes indiretos irá melhorar os programas de sanidade animal, pois são mais rápidos e fáceis de aplicar.

As instituições devem possuir uma estrutura adequada, que obedeça às normas ou medidas sanitárias, diminuindo o risco de disseminação de patógenos. Os recintos devem ser formulados de maneira que evite a contaminação dos alimentos e da água por fezes; que permita uma limpeza e desinfecção adequada; que evite o contato dos animais com o público visitante e o contato com alimentos e objetos que podem ser jogados nos recintos, através da utilização de barreiras de vidro ou de fossos. A utilização de barreira de vidro é usada desde a década de 30 em muitos países da Europa e nos Estados Unidos, podendo-se observar uma

diminuição da incidência da doença nesses locais (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001). O ambiente nos recintos deve propiciar adequada condição de manutenção dos animais em cativeiro, através da reprodução das características ambientais do local da sua origem e da utilização de medidas de enriquecimento ambiental. Deve-se também colocar o menor número possível de animais por recinto (BUSHMITZ et al., 2008; OIE, 2011). Assim, adotando essas medidas, consegue-se diminuir o estresse dos animais, melhorando sua saúde e consequentemente evitando a disseminação da infecção.

A formação de uma equipe treinada e capacitada é essencial para a aplicação adequada das ações e para a continuidade dos programas de prevenção e controle da tuberculose dentro das instituições que mantêm primatas em cativeiro. Atualmente, observa-se que ainda ocorre uma grande rotatividade de funcionários, como administradores, veterinários, biólogos e zootecnistas, nos zoológicos públicos brasileiros (CUBAS, 2008), prejudicando o andamento dos programas de sanidade animal.

A manutenção e 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 e, portanto, tanto os humanos quanto os animais podem transmitir uns aos outros. As instituições devem possuir um programa de saúde dos funcionários, contemplando todas as informações, deveres e obrigações que eles devem seguir, garantindo a conservação da sua saúde e consequentemente a dos animais. Recomenda-se que testes para tuberculose seja feito antes do primeiro contato e depois pelo menos uma vez ao ano (IALEGGIO, 1997), dessa maneira consegue-se fazer um monitoramento da saúde da equipe.

Diferente do que podemos observar nos países da Europa e da América do Norte, no Brasil não existe uma legislação que especifique os procedimentos, que devem ser adotados após a aquisição de novos animais, e que regulamenta e especifica os procedimentos de quarentena pelos zoológicos e outras instituições que mantêm animais silvestres em cativeiro, fato que prejudica a fiscalização desses locais pelos órgãos competentes, pois não há uma base legal para poder cobrar as instituições quanto às medidas de quarentena.

Atualmente as leis que citam a necessidade de quarentena são:

- A Lei nº 7173, 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 IBDF - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (BRASIL, 1983), mas não cita a necessidade de colocar esses animais em quarentena. No artigo 12º desta 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 7732, 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 7735, 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 descreve e estabelece essas exigências.

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

Tendo em vista essas falhas na legislação e sabendo da urgência em se regulamentar a questão a fim de normatizar 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.

12 CONCLUSÃO

A natureza insidiosa da tuberculose e os limites dos testes diagnósticos usados atualmente continuam a ser um desafio para aqueles que mantêm primatas em cativeiro (IALEGGIO, 1997; CAPUANO et al., 2003; FROST, 2006; BUSHMITZ et al., 2008; LERCHE et al., 2008; LIN et al., 2008; MCMANAMON, 2008), havendo a necessidade de mais pesquisa para o desenvolvimento de testes indiretos rápidos, que possibilitariam melhorar a eficácia dos programas de controle e prevenção da tuberculose nesses animais.

A aplicação de programas de controle e vigilância de doenças são peças importantes para a manutenção da saúde dos animais e para a saúde daqueles que tem contato com esses eles. O custo com a vigilância é mínimo quando considerado os efeitos da doença sobre os animais, principalmente quando se trata daqueles ameaçados de extinção (FROST, 2006).

O Brasil se encontra atrasado, se comparado com a situação dos países da Europa e da América do Norte, onde desde meados do século XX já existem procedimentos de quarentena e leis que regulamentam esses procedimentos. Esse assunto ainda é pouco explorado, havendo a necessidade da criação de leis que especifiquem e detalhem os procedimentos de quarentena que devem ser adotados pelas instituições mantedoras de animais silvestres e guias de prevenção e controle da tuberculose. Outro ponto relevante é que pouco se sabe sobre a situação da doença dentro das instituições brasileiras, havendo escassos estudos e publicações de casos.

Diante desses fatos, há muito que se estudar e pesquisar, e o Brasil deve se espelhar nos outros países, para poder melhorar a sanidade animal dentro de nossos zoológicos e de outras instituições que mantêm primatas não humanos em cativeiro.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis* : considerações gerais e a importância dos reservatórios animais**. 1998. 318 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- 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.
- 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 disinfectants 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. 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. 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 das 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. 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. 23489/490. 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.

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 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, 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. Sec. 01, p. 121-128. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-fauna-silvestre/legislacao>>. Acesso em: 19/10/2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal-PNCEBT**. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006. p. 51-71. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso: 07/08/2011.

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

BROSMAN, S. A. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy: Techniques and results. **Urologic Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 557 – 564, 1992.

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.

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.

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. 1-11, 2008.

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.

CATÃO-DIAS, J. L.; CARVALHO, V. M.; Tuberculose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagem-medicina veterinária**. São Paulo: Rocca, 2006. cap. 43, p. 726-735.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. 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.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Tuberculose. In: _____. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 317-337.

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.

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.

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

DESEM, N.; JONES, S. L. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n.4, p. 531–536, 1998.

DUKELOW, W.R.; PIERCE, D.L. Identifying false positive TB reactions in New World Primates. **International Journal of Primatology**, v. 8, p. 556, 1987.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 93-129, 2001.

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. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1179-1188, 2006.

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. Biology of the mycobacterioses. Simian tuberculosis: Immunologic aspects. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 154, n. 1, p. 200-213, 1968.

GOOD, R. C. Diseases in nonhuman primates. In: KUBICA, G. P.; WAYNE, L. G. (Eds.). **The Mycobacteria: A Sourcebook**. New York: Dekker, 1984. p. 903–924.

GORDON, S. V.; BROSCHE, R.; BILLAULT, A.; GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; COLE, S. T. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 643–655, 1999.

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.

HOOP, R. K. Public health implications of exotic pet mycobacteriosis. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 6, n. 1, p. 3–8, 1997.

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**. 5th 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.; SCHOOLS, 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.

KANEENE, J. B.; THOEN, C. O. Tuberculosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 5, p. 685-691, 2004.

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.

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.

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.

LEE, H.; PARK, H. J.; CHO, S. N.; BAI, G. H.; KIM, S. J. Species identification of mycobacteria by PCR-restrictions fragment length polymorphism of the rpoB gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2966-2971, 2000.

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. 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.;

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.

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 Épipizooties**, 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.

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.; 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.

MICHEL, A. L.; BEGINS, R. G.; KEET, D. F.; HOFMEYER, 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.

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 Épipizooties**, 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.; BABORN, 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.

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.

PRINDLE, R. F. Phenolic compounds. In: BLOCK, S. S (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. p. 197-224.

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.

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.

RENQUIST, D. M.; POTKAY, S. *Mycobacterium scrofulaceum* infection in *Erythrocebus patas* monkeys. **Laboratory Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 97–101, 1979.

ROBERTS, J. A.; ANDREWS, K. Nonhuman primate quarantine: its evolution and practice. **ILAR Journal**, v. 49, n. 2, p. 145-156, 2008.

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. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE, G. A. J. (Ed.). **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. London: Blakwell, 1982. p. 107-133.

RUSSELL, A. D. Activity of biocides against mycobacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 81, p. 87-101, 1996.

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.

SILVA, J. C. R.; CORRÊA, S. H. R. Manejo sanitário e biosseguridade. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 1226-1244.

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.

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, 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 Antropología 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 fev. 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.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

TIRUVILUAMALA, P.; REICHMAN, L. B. Tuberculosis. **Annual Review of Public Health**, v. 23, p. 403–426, 2002.

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.

THOEN, C. O.; WILLIAMS, D. E. Tuberculosis, tuberculoidoses and other mycobacterial infections. In: BERAN, G. W. (Ed.). **Handbook of zoonoses**. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic diseases, 2. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p. 41-59.

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.

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.

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.

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

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 ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH-OIE. **Terrestrial Animal Health Code**. Paris: OIE, 2011. Disponível em <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>. Acesso: 13 out. 2011.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1-5, 2001.