

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

**Tuberculose em suídeos (*Sus scrofa*) domésticos e asselvajados:
aspectos patológicos e epidemiológicos**

Bruna Correa Lopes

Porto Alegre, 26 de Fevereiro de 2021

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

**Tuberculose em suídeos (*Sus scrofa*) domésticos e asselvajados:
aspectos patológicos e epidemiológicos**

Autora: M.V. Bruna Correa Lopes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Coorientadora: Dra. Fabiana Quoos Mayer

Porto Alegre, 26 de Fevereiro de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes, Bruna Correa

Tuberculose em suídeos (*Sus scrofa*) domésticos e asselvajados: aspectos patológicos e epidemiológicos / Bruna Correa Lopes. -- 2021.

81 f.

Orientador: David Driemeier.

Coorientadora: Fabiana Quoos Mayer.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Tuberculose animal. 2. *Metastrongylus* sp.. 3. Coinfecção. 4. Suínos domésticos. 5. Suídeos asselvajados. I. Driemeier, David, orient. II. Mayer, Fabiana Quoos, coorient. III. Título.

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

INSTITUIÇÕES

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Avenida Bento Gonçalves, 9090 - Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS, 91540-000

Instituto De Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF

Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária

Secretaria de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural

Estrada Do Conde, 6000 – Sans Souci, Eldorado do Sul, RS, 92990-000

HIERARQUIZAÇÃO

Área: Ciências Veterinárias

Sub-área: Medicina Veterinária Preventiva e Patologia

Especialidade: Patologia Animal e Patologia Clínica

Linha de Pesquisa: Patobiologia Aplicada à Veterinária

Bruna Correa Lopes

**Tuberculose em suídeos (*Sus scrofa*) domésticos e asselvajados: aspectos
patológicos e epidemiológicos**

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2021

Aprovado por:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Comissão

Dra. Fabiana Quoos Mayer
Coorientadora

Dra. Virginia Santiago Silva
Membro da Comissão

Dra. Karine Ludwig Takeuti
Membro da Comissão

Profa. Dra. Luciana Sonne
Membro da Comissão

Profa. Dra. Mary Jane Tweedie de Mattos Gomes
Membro da Comissão (Suplente)

RESUMO

A tuberculose animal é uma doença infecciosa crônica com distribuição mundial causada por *Mycobacterium bovis*, que pode afetar inúmeras espécies mamíferas, incluindo os suídeos. No caso dos suínos domésticos, há preocupação com as possíveis perdas econômicas pela diminuição de rendimento, descarte de animais infectados e pelo potencial de transmissão da tuberculose para humanos. Já os javalis, suídeos asselvajados que possuem comportamento migratório, representam um risco à saúde animal por terem contato direto com animais de produção e representam risco ocupacional para controladores¹. Uma importante característica a ser avaliada em suídeos asselvajados é a ocorrência de infecções concomitantes e como uma determinada coinfeção pode influenciar na manifestação da tuberculose. Sabe-se que coinfeções podem alterar a resposta imunológica do hospedeiro a uma determinada doença. Nesse trabalho, dois estudos foram conduzidos. O primeiro deles teve como objetivo avaliar a frequência de infecção por *M. bovis* e por *Metastrongylus* spp. em suídeos asselvajados e os potenciais fatores de risco associados à ausência de lesões macroscópicas de tuberculose nos animais estudados. Para isso, foram avaliados 77 animais; destes, 37,7% (29/77) apresentaram resultado positivo para detecção de *M. bovis* considerando os resultados obtidos nas técnicas de PCR e isolamento bacteriano, dos quais 89,6% (26/29) não apresentaram lesões macroscópicas características de tuberculose. No que se refere a infecção por *Metastrongylus* sp., 77,9% (60/77) dos animais estavam infectados pelo nematódeo. Ainda, a frequência de coinfeção por ambos os agentes foi de 82,7% (24/29); no entanto, não houve associação entre *Metastrongylus* sp. e a ausência de lesões granulomatosas em animais com tuberculose, o único fator relacionado a ausência de lesões em animais com tuberculose foi o subpeso. A ausência de lesões em javalis com *M. bovis* é preocupante, principalmente para controladores que manuseiam suas carcaças e que podem presumir que o animal está saudável, situação que representa risco ocupacional. Estudos avaliando outras explicações para a ausência de lesões nesses animais, como a virulência das micobactérias, a possível resistência genética dos animais à infecção, ou a ocorrência de outras coinfeções devem ser avaliados para um melhor entendimento desses resultados. No segundo estudo dessa dissertação, o objetivo foi relatar a ocorrência de um surto de tuberculose em suínos domésticos de

¹ Caçadores habilitados pelo IBMA para caça/controlado de suídeos asselvajados no Brasil.

criação intensiva no Rio Grande do Sul. Durante a inspeção no abate, lesões granulomatosas foram observadas e coletadas para diagnóstico confirmatório de tuberculose. Os animais não apresentavam sinais clínicos e lesões granulomatosas foram identificadas em 0,73% (59/8.071) deles, confirmadas por histologia como sugestivas de tuberculose. *M. bovis* foi confirmado como agente etiológico dessas lesões através da bacteriologia e PCR. Dados de frigoríficos com vigilância sanitária federal demonstram prevalência de tuberculose animal < 0,001% no Brasil; sendo assim, os resultados apresentados mostram um surto de tuberculose em suínos de criação intensiva. A infecção de suínos pode estar relacionada à exposição a animais infectados, ambiente ou alimentos contaminados e medidas de biossegurança devem ser tomadas para evitar a disseminação da doença. Embora granjas certificadas de reprodutores suínos adotem essas medidas, esse relato indica a importância do monitoramento constante e maior controle nas unidades produtoras de suínos. A tuberculose animal é uma doença de caráter zoonótico de importância negligenciada. Os resultados desse estudo demonstram que é necessária a constante vigilância de sua situação epidemiológica em suínos e em espécies silvestres suscetíveis à infecção.

ABSTRACT

Animal tuberculosis is a worldwide chronic infectious disease caused by Mycobacterium bovis, which can affect a large number of mammalian species, including swine. In the case of domestic swine, there is concern about possible economic losses due to reduced yield, disposal of infected animals and the potential for tuberculosis transmission to humans. Wild boars, which are free-ranging swine that have migratory behavior, represent a risk to animal health because they have direct contact with livestock and represent occupational risk for hunters. An important characteristic to be evaluated in wild boars is the occurrence of concomitant infections and how the presence of a particular co-infection can influence the manifestation of tuberculosis. It is known that co-infections can alter the host's immune response to a certain disease. In this work, two studies were conducted. The first one aimed to evaluate the frequency of infection by M. bovis and by Metastrongylus sp. in wild boar and the potential risk factors associated with the absence of macroscopic tuberculosis-like lesions in the evaluated animals. For this, 77 animals were evaluated; of these, 37.7% (29/77) had positive results for detection of M. bovis through PCR and bacteriology analysis, of which 89.6% (26/29) did not present macroscopic lesions characteristic of tuberculosis. Regarding Metastrongylus sp., 77.9% (60/77) of the animals were infected with the nematode. In addition, the frequency of co-infection by both agents was 82.7% (24/29); however, there was no association between Metastrongylus sp. infection and the absence of granulomatous lesions. The factor related to this outcome was the animals' underweight. The absence of lesions in wild boars infected with M. bovis is a concern, especially for hunters who handle their carcasses and who can assume that the animal is healthy, a situation that represents occupational risk. Studies to evaluate other explanations for the absence of lesions in these animals, such as the mycobacteria virulence, the possible genetic resistance of animals to infection, or the occurrence of other co-infections should be evaluated to better understand these results. In the second study of this dissertation, the objective was to report the occurrence of a tuberculosis outbreak in domestic pigs of intensive rearing system in Rio Grande do Sul, Brazil. During slaughter inspection, granulomatous lesions were observed and collected for confirmatory diagnosis of tuberculosis. The animals showed no clinical signs and granulomatous lesions were identified in 0.73% (59/8,071) of them, confirmed by histology as suggestive of tuberculosis. M. bovis

was confirmed as the etiological agent of these lesions through bacteriology and PCR. Data from slaughterhouses with Federal Surveillance show a prevalence of animal tuberculosis <0.001% in Brazil; therefore, the presented results show a tuberculosis outbreak in the intensive rearing system. Swine infection can be related to exposure to infected animals, contaminated environment or food, and biosafety measures must be taken to prevent the disease spread. Although, certified farms adopt these measures, this report indicates the importance of constant monitoring and greater control in the swine farms. Animal tuberculosis is a disease of zoonotic character and neglected importance. The results of this study show that constant surveillance of its epidemiological situation in swine and wild species susceptible to infection is crucial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Principais células da imunidade inata no hospedeiro, receptores de reconhecimento de padrões e funções celulares envolvidas na defesa imunológica inata contra o *M. tuberculosis*. Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2017). 18
- Figura 2 Dinâmica da formação e patologia do granuloma na tuberculose. Fonte: Adaptado de Ehlers e Schaible (2012). 20
- Figura 3 Resposta imunológica na tuberculose. Fonte: Adaptado de Pollock e Neill (2002). 25
- Figura 4 Transmissão da tuberculose animal entre espécies silvestres, animais de produção e humanos. Fonte: Adaptado de Garine-Wichatitsky *et al.* (2013). 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADV	Do inglês <i>Aujeszky's Disease Virus</i>
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
PPDa	Derivado Proteico Purificado de <i>M. avium</i>
PPDb	Derivado Proteico Purificado de <i>M. bovis</i>
bTB	Tuberculose Bovina
CCL3	Do inglês <i>Chemokine C Ligand 3</i>
CTLs	Do inglês <i>Cytotoxic T Cell</i>
IAV	Do inglês <i>Swine Influenza Virus</i>
ELISA	Do inglês <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
GM-CSF	Do inglês <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRSC	Granja de Reprodutores Suídeos Certificada
GTP	Do inglês <i>Nucleotide Guanosine Triphosphate</i>
HIV	Do inglês <i>Human immunodeficiency vírus</i>
H	Histologia
IL	Interleucina
IFN	Interferon
Inos	Do inglês <i>induced Nitric Oxid</i>
MAIT	Do inglês <i>Mucosal Associated Invariant T Cell</i>
NADPH	Do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NK	Do inglês <i>Natural Killer</i>
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCV2	Do inglês <i>Porcine Circovirus Type 2</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TCH	Do inglês <i>thiophene-2-carboxylic acid hydrazide</i>
Th	Do inglês <i>T helper</i>
TNF	Do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA E REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Tuberculose animal.....	15
3.1.1 Etiologia	15
3.1.2 Patogênese	16
3.1.3 Resposta imunológica.....	21
3.1.3.1 Imunidade celular.....	21
3.1.3.2 Imunidade humoral.....	22
3.1.3.3 Citocinas.....	22
3.1.3.4 Regulação da resposta imunológica.....	23
3.1.4 Diagnóstico e Controle	24
3.1.4.1 Diagnóstico <i>in vivo</i>	24
3.1.4.2 Diagnóstico <i>post-mortem</i>	25
3.1.5 Tuberculose em Animais Silvestres	27
3.1.5.1 Tuberculose em suídeos asselvajados.....	28
3.1.6 Tuberculose animal em suínos domésticos	30
3.2 <i>Metastrongylus</i> sp.	32
3.2.1 Resposta imunológica.....	33
3.3 Coinfecções em suídeos asselvajados associadas a tuberculose animal.....	34
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. Objetivo geral	36
4.2. Objetivos específicos	36
5. ARTIGO CIENTÍFICO I	37
6. ARTIGO CIENTÍFICO II.....	55
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
8. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICE A – ISOLADOS DE <i>M. bovis</i>.....	80

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença de distribuição mundial, causada pelo microrganismo *Mycobacterium bovis*. A doença possui caráter crônico e progressivo, levando o animal a desenvolver sinais clínicos diversos, como dificuldade respiratória, tosse, espirros e emagrecimento, além do prejuízo econômico causado pelo descarte de animais infectados (MARKEY *et al.*, 2013).

M. bovis também pode causar doença em humanos, nos quais a infecção ocorre principalmente através da ingestão de alimentos contaminados, como leite não pasteurizado. Além do risco zoonótico da tuberculose animal, ela pode ocorrer em diversas espécies de mamíferos, incluindo os suídeos (BARANDIARAN *et al.*, 2015). Nesses casos, é preferível a utilização do termo tuberculose animal para se referir à doença.

A principal via de infecção nos suínos domésticos é a ingestão de alimentos contaminados, o que ocasiona o desenvolvimento de lesões nos linfonodos do sistema digestório (SCHWARZ *et al.*, 2002). Quando ocorre a identificação de lesões granulomatosas durante o abate, as bactérias do Complexo *Mycobacterium avium* são mais comumente reportadas, e as lesões são denominadas “linfadenites”. Dados disponíveis sobre tuberculose e linfadenite em suídeos domésticos indicam prevalência <0,001% e 0,81%, respectivamente entre 2012 e 2014 no Brasil em abatedouros com Inspeção Federal (COLDEBELLA *et al.*, 2018).

O controle da tuberculose animal se dá através do diagnóstico de animais vivos, no qual animais infectados são encaminhados para abate sanitário, e através da vigilância em abatedouros. No entanto, existem fatores que contribuem com a falha no controle da doença, como a não obrigatoriedade de testagem, a falta de vacina e a aglomeração de animais (MCDONALD, 2014). Aliado a isso, existe o risco de espécies de vida livre atuarem na manutenção da tuberculose em uma determinada região (THOEN; STEELE; GILSDORF, 2006). Assim, para que haja um controle efetivo da tuberculose animal são necessárias medidas de prevenção e monitoria considerando esses potenciais hospedeiros silvestres.

Dentre os animais de vida livre, os suídeos asselvajados ou javalis (*Sus scrofa*) representam uma importante espécie na cadeia epidemiológica da tuberculose animal (MACIEL *et al.*, 2018). Esses animais podem atuar como reservatórios, além de favorecer a disseminação da doença devido à característica migratória da espécie (BARRIOS-GARCIA; BALLARI, 2012). No Brasil, estudos sobre a tuberculose em

suídeos asselvajados ainda são escassos. Um estudo prévio mostrou a ocorrência da doença em javalis oriundos do Rio Grande do Sul. Além de *M. bovis*, inúmeros outros patógenos já foram identificados em suídeos asselvajados no mundo, como Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV2), Vírus da Doença de Aujeszky (ADV), Vírus da Influenza Suína (SIV), Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSv), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Glaesserella parasuis* e *Metastrongylus* spp. (RISCO *et al.*, 2014). A infecção por estes agentes, sozinhos ou concomitantemente, pode modificar a resposta imunológica do animal frente à infecção por *M. bovis*, de maneira similar ao que ocorre em humanos coinfectados com HIV e *M. tuberculosis* por exemplo (GELDMACHER; ZUMLA; HOELSCHER, 2012).

Em vista disso, o presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de tuberculose em suídeos asselvajados e relatar a ocorrência de um surto de tuberculose em suínos domésticos de granjas comerciais. Ainda, nos suídeos asselvajados, foi avaliado o papel da coinfeção de *M. bovis* e *Metastrongylus* spp. e sua influência na ocorrência de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose.

2. JUSTIFICATIVA

A avaliação da tuberculose em suídeos asselvajados é importante, pois esses animais podem estar relacionados à cadeia de transmissão da doença no Brasil. Os suídeos asselvajados podem representar risco à saúde animal pelo potencial convívio com espécies domésticas, e para saúde humana, no que se refere aos controladores que manipulam suas carcaças. Ainda, o estudo da manifestação da tuberculose em javalis é necessário, já que nosso grupo de pesquisa reportou a ausência de lesões macroscópicas em animais infectados (MACIEL *et al.*, 2018). Assim, a ocorrência de coinfeções é uma hipótese a ser testada, porque elas podem influenciar na resposta imunológica do animal e por consequência no desenvolvimento de lesões.

Além do estudo da tuberculose em suídeos asselvajados, é necessária a vigilância constante de espécies domésticas que podem ser afetadas pela doença como é o caso dos suínos. Apesar de representarem uma importante fonte de proteína animal (ABPA, 2019), há escassez de dados referentes à tuberculose nesses animais. Alguns autores afirmam que a prevalência de tuberculose em suínos de países nos quais a doença é endêmica pode ser semelhante à prevalência no rebanho bovino (GHAVIDEL *et al.*, 2018). Além disso, quando infectados por *M. bovis*, estes animais podem representar risco à saúde humana. Assim, a investigação da ocorrência de tuberculose animal em suínos domésticos pode trazer dados importantes, tanto sob a perspectiva da saúde animal, quanto da saúde pública.

3. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA E REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Tuberculose animal

A tuberculose animal é uma doença causada principalmente por *M. bovis*. A doença possui um caráter crônico e progressivo, levando o animal a desenvolver sinais clínicos diversos, como dificuldade respiratória, tosse, espirros e emagrecimento (MARKEY *et al.*, 2013). A tuberculose se destaca pelo prejuízo econômico causado pelo descarte de animais infectados, pelo potencial zoonótico e por ser uma doença que afeta muitas espécies (COUSINS, 2018). Em alguns países da América, Europa e África, a tuberculose animal é considerada uma doença enzoótica, tendo maior impacto sobre a economia e sobre a saúde pública (THOEN; STEELE; GILSDORF, 2006).

Além da tuberculose animal ter potencial de afetar inúmeras espécies mamíferas, o microrganismo causador da doença pode se manter no indivíduo por longos períodos, enquanto é transmitido para outros animais. Devido à cronicidade e ao grande potencial de dispersão, a tuberculose é considerada uma doença de difícil controle e erradicação, sendo necessário, muitas vezes, o controle da doença em diferentes espécies suscetíveis à infecção (MCDONALD, 2014).

3.1.1 Etiologia

A tuberculose animal pode ser causada por qualquer espécie do complexo *M. tuberculosis*, sendo *M. bovis* o principal agente etiológico da tuberculose animal. Porém, sugestões recentes de mudança na taxonomia do complexo fizeram com que as espécies pertencentes ao grupo, a saber, *M. africanum*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*, devido à alta semelhança genética pudessem ser consideradas variantes da espécie *M. tuberculosis*. Atualmente, essas mudanças continuam em debate e o órgão responsável por definir os nomes de espécies procarióticas (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) manteve a nomenclatura da espécie como *M. bovis* (RIOJAS *et al.*, 2018).

O gênero *Mycobacterium* é caracterizado por formar bastonetes finos de comprimentos variados (0,2 a 0,6 x 1,0 a 10 µm) e que não são corados pela Coloração de Gram, desenvolvida por Hans Christian Joachim Gram. As micobactérias possuem altas concentrações de Ácido Micólico e outros lipídios em sua parede celular o que, após a coloração, torna difícil a descoloração com ácidos e

álcoois. Essa característica do gênero faz com que elas sejam classificadas como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR) (MARKEY *et al.*, 2013).

O gênero *Mycobacterium* compreende micro-organismos aeróbicos, imóveis e incapazes de formar esporos e hifas aéreas. O gênero pode ser dividido, a partir da Classificação de Runyon, em micobactérias de crescimento rápido e lento (BRASIL, 2008). As micobactérias de crescimento lento demoram mais que sete dias para formar colônias observáveis em meio de cultura específico, enquanto as micobactérias de crescimento rápido formam colônias em até sete dias. Em média o tempo geração, isto é, o tempo em que cada célula bacteriana se divide para formar duas células bacterianas, varia de 2 a 20 horas no gênero *Mycobacterium* (CARTER; WISE, 2004).

A alta concentração de lipídeos nas micobactérias, que pode variar de 20% a 60% do peso seco da bactéria, pode estar envolvida com a resistência da bactéria à imunidade humoral do hospedeiro e está diretamente envolvida na resistência a compostos químicos, como desinfetantes. Assim, as micobactérias podem permanecer viáveis no solo e matérias orgânicas, podendo estar amplamente distribuídas no ambiente (YOUNG; GORMLEY; WELLINGTON, 2005). Ainda, *M. bovis* pode permanecer viável em carcaças por até 4 anos e nas fezes por pelo menos 150 dias. Desta forma, muitos animais se infectam a partir do contato com carcaças ou fezes contaminadas, como é o caso dos javalis e algumas outras espécies de animais que acabam consumindo essas carcaças contaminadas. *M. bovis* pode ser encontrado em descargas respiratórias, fezes, leite, urina e sêmen de animais infectados (MARKEY *et al.*, 2013).

Algumas espécies animais são descritas como resistentes à infecção por *M. bovis*, como é o caso das aves. No entanto, quase todos os mamíferos são suscetíveis à infecção e dentre as espécies afetadas estão descritos casos em primatas, bovinos, ovinos, caprinos, suínos, equinos, caninos, felinos e outras espécies (COUSINS, 2018).

3.1.2 Patogênese

A literatura científica sobre a patogênese e a resposta imunológica à tuberculose é majoritariamente voltada a tuberculose humana. No entanto, sabe-se que o desenvolvimento da doença se manifesta de maneira similar em animais e em humanos.

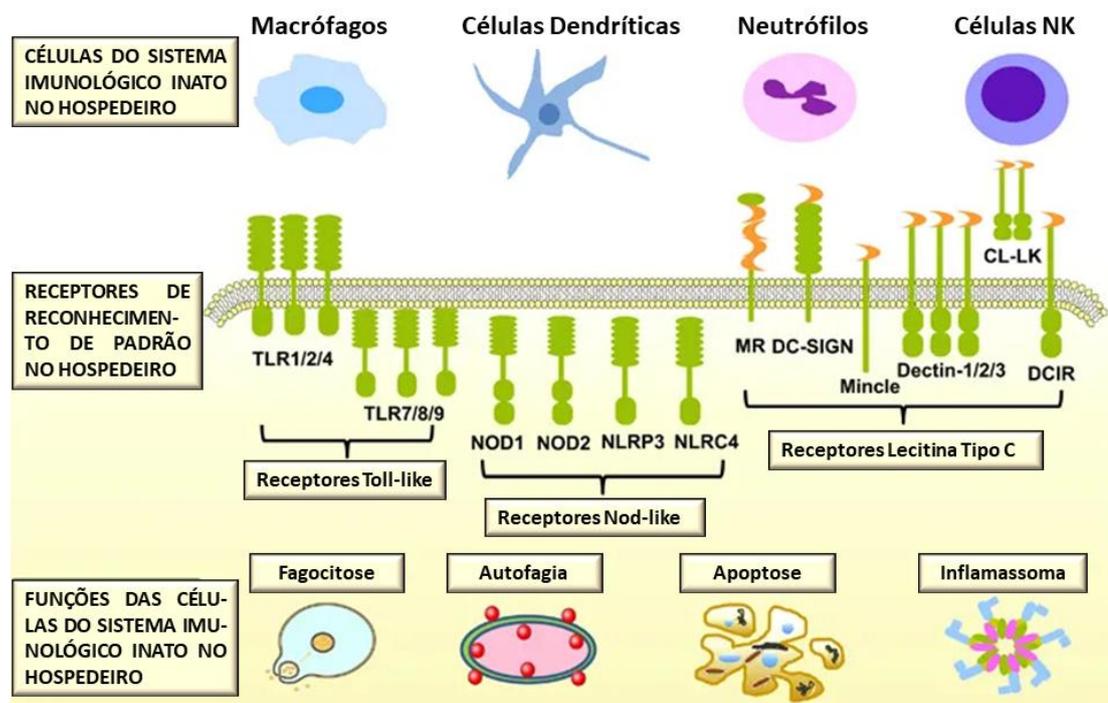
A patogênese da tuberculose ocorre devido à resposta imunológica desenvolvida a partir da presença da bactéria no organismo e está diretamente relacionada à via de infecção. Portanto, se um animal é infectado pela via respiratória, ele desenvolverá lesões nos linfonodos do sistema respiratório e no pulmão, enquanto que quando um animal é infectado pela via digestória, ele desenvolverá lesões nos linfonodos do sistema digestório, intestinos e sistema porta do fígado (COUSINS, 2018). A maioria dos focos de infecção é microscópica e desaparece, porém alguns podem persistir e levar ao desenvolvimento de lesões granulomatosas, características da tuberculose (CARTER; WISE, 2004).

Quando a infecção ocorre pela via respiratória, aerossóis são veiculados pelo ar, sendo capazes de infectar um hospedeiro suscetível. Os aerossóis possuem cerca de 1 a 5 μm de diâmetro, veiculam BAAR e dependendo das condições do ambiente, podem permanecer infectantes e suspensos no ar por horas (JENSEN *et al.*, 2005). Após a inalação da bactéria, ocorre sua fagocitose por um macrófago alveolar. *M. tuberculosis* continua sua multiplicação lenta e eventualmente causa a lise do macrófago sendo fagocitado novamente por outro macrófago, originando assim, a resposta inflamatória primária à infecção (THOEN; STEELE; GILSDORF, 2006). *M. tuberculosis* consegue impedir que os lisossomos do macrófago se fusionem ao fagossomo, evitando sua fagocitose e morte celular. Consequentemente, células bacterianas que escapam da fagocitose por macrófagos são filtradas pelo sistema linfático e produzirão lesões nos linfonodos da região afetada (DOMINGO; VIDAL; MARCO, 2014).

A maioria dos BAAR fagocitada pelos macrófagos alveolares é destruída ou impedida de se multiplicar. No entanto, algumas células bacterianas remanescentes são liberadas após a morte do macrófago e dão início a sua replicação. Após um período de duas a oito semanas são formados os granulomas, lesões organizadas formadas por macrófagos, linfócitos e fibroblastos (COUSINS, 2018). Se o sistema imunológico não conseguir impedir a multiplicação do microrganismo, ocorre o desenvolvimento da doença. Alguns BAAR podem atingir a corrente sanguínea e, assim se distribuir pelo organismo, podendo afetar órgãos que normalmente não são acometidos pela doença, como: laringe, fígado, medula espinhal, ossos e rins (JENSEN *et al.*, 2005).

A imunidade inata está envolvida nos estágios iniciais da tuberculose através do recrutamento das células inflamatórias para o local de infecção. A invasão bacteriana estimula o recrutamento de fagócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, células dendríticas e células *natural killer* (NK) e substâncias antimicrobianas, além de estimular a inflamação e o desenvolvimento de febre (TORTORA; FUNKE; CASE, 2018a) (Figura 1).

Figura 1 – Principais células, receptores e funções celulares envolvidos na defesa imunológica inata a partir da infecção por *M. tuberculosis*.



M. tuberculosis infecta majoritariamente as células da imunidade inata, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK. Essas células reconhecem o agente através de receptores, incluindo do tipo *Toll-like*, *Nod-like* e de Lectina do tipo C. Durante a infecção, a sinalização desses receptores dá início a uma variedade de funções celulares, como fagocitose, autofagia, apoptose e ativação do inflamassoma para controlar ou eliminar a bactéria. Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2017).

A formação do granuloma ocorre quando linfócitos T detectam macrófagos infectados e liberam uma série de citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), e quimiocinas, como a Quimiocina CC ligante 3 (CCL3). A liberação dessas substâncias leva ao recrutamento de macrófagos, neutrófilos e células B para o local onde o granuloma será formado. Juntamente ao TNF, o *Interferon-gama* (IFN- γ) e os

linfócitos T auxiliam na manutenção da arquitetura do granuloma (SAUNDERS *et al.*, 2005).

Os macrófagos presentes no granuloma são ativados por citocinas como o IFN- γ , que funciona de maneira a evitar a replicação e conseqüente dispersão das micobactérias. O IFN- γ é produzido por linfócitos T (CD8⁺ e CD4⁺), macrófagos, células muco-epiteliais e células NK, sendo conhecido como o dogma central da imunidade protetora à tuberculose por sua importância nas fases iniciais da infecção (NUNES-ALVES *et al.*, 2014).

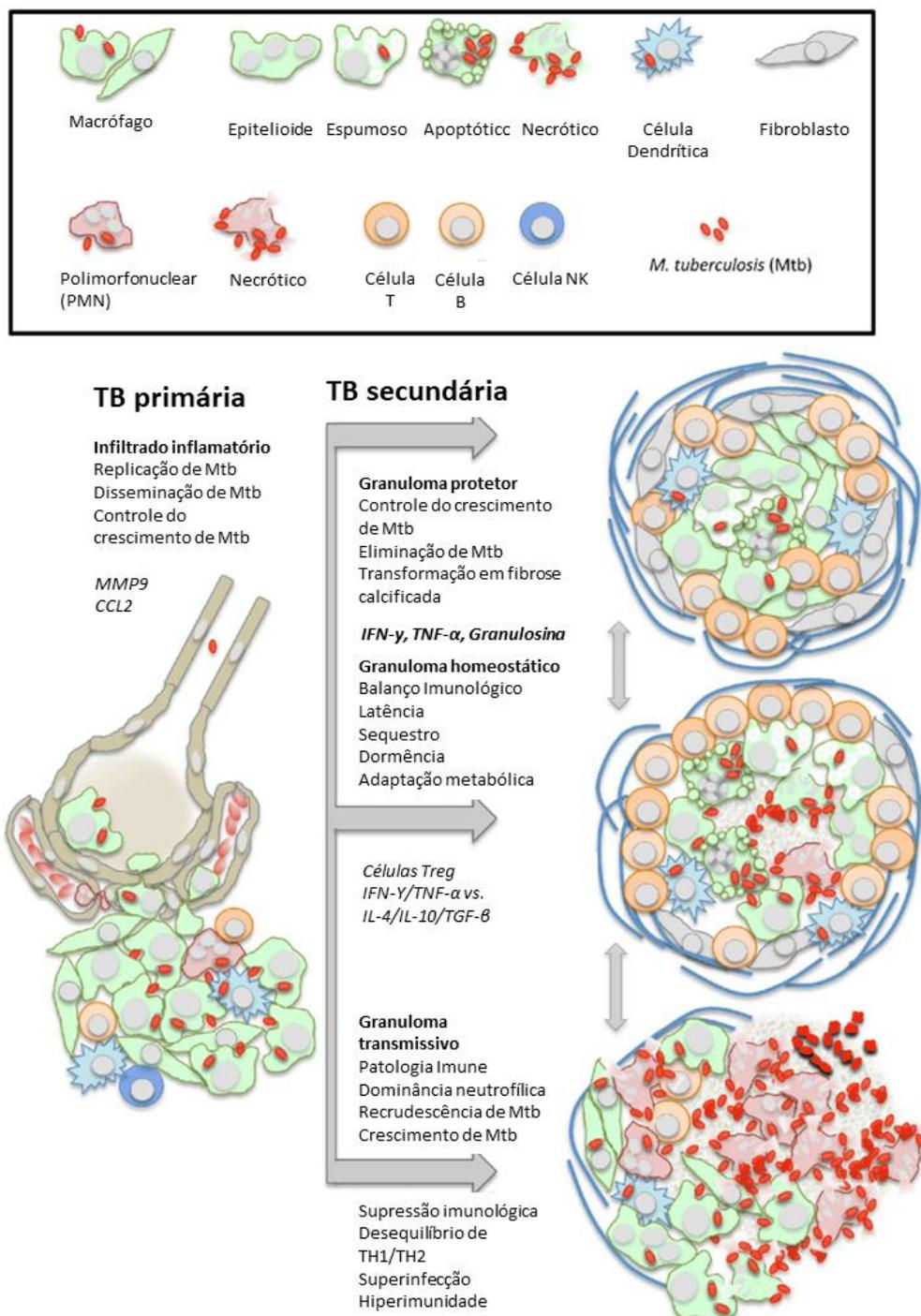
Após a formação do granuloma, pode haver aumento das lesões, iniciando-se um processo de necrose nos centros das mesmas, classificada como necrose caseosa – chamada assim por conter grandes quantidades de cálcio e ácidos graxos e possuir coloração branca (THOEN; STEELE; GILSDORF, 2006). Nessa etapa, células gigantes do tipo Langhans são formadas através da multiplicação dos núcleos dos macrófagos sem a divisão do citoplasma, podendo uma célula conter mais de 10 núcleos (KUMAR *et al.*, 2013). Ainda, lesões granulomatosas antigas apresentam uma cápsula resistente de tecido conjuntivo circundando a lesão (DOMINGO; VIDAL; MARCO, 2014).

A disseminação da bactéria pela via linfática leva à resposta imunológica adaptativa (TORTORA; FUNKE; CASE, 2018b). Isso acontece em decorrência de células dendríticas apresentarem os antígenos bacterianos aos linfócitos T, que se diferenciam em linfócitos T efetores. Essas células migram para os tecidos através da via hematogênica junto a outros leucócitos e iniciam o processo de formação dos granulomas (NUNES-ALVES *et al.*, 2014).

A importância dos linfócitos T na manutenção dos granulomas passou a ser observada a partir do aumento de infecções pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) concomitantes ao desenvolvimento da tuberculose nos pacientes que estavam infectados pelo vírus (LAWN; BUTERA; SHINNICK, 2002). Entretanto, além da manutenção da estrutura dos granulomas, os linfócitos T CD4⁺ podem levar à necrose tecidual, e conseqüentemente permitir que bactérias, que antes estavam contidas no granuloma, atinjam a via respiratória e sejam transmitidas para terceiros nos casos de tuberculose pulmonar. Ao contrário do que anteriormente se pensava, o granuloma possui uma estrutura dinâmica e em alguns casos, pode ocorrer diminuição ou aumento do seu tamanho (NUNES-ALVES *et al.*, 2014) (Figura 2).

Em humanos, sabe-se que pode ocorrer o desenvolvimento de infecção latente da tuberculose quando há encapsulamento das células bacterianas através da formação do granuloma, não havendo transmissão da doença nesta etapa (JENSEN *et al.*, 2005). Porém, a formação da cápsula (granuloma) não impede que a pessoa desenvolva a doença. Para detectar a tuberculose latente é possível fazer o teste de *Mantoux* ou a detecção do IFN- γ entre duas a oito semanas após a infecção inicial (WHO, 2019).

Figura 2 – Dinâmica da formação e patologia do granuloma na tuberculose.



M. tuberculosis provoca um infiltrado inflamatório local que pode dar origem a (1) uma imunidade protetora, (2) inflamação equilibrada ou homeostática (isto é, controle do crescimento bacteriano com pouco dano tecidual) ou (3) transmissão entre os brônquios após necrose tecidual. Os tipos de granulomas organizados são idealizados e representam estágios da fisiopatologia da formação da lesão. Palavras em itálico indicam mediadores envolvidos na diferenciação do granuloma. Fonte: Adaptado de Ehlers; Schaible (2013).

3.1.3 Resposta imunológica

3.1.3.1 Imunidade celular

Como mencionado anteriormente, a resposta imunológica tem um papel fundamental no desenvolvimento dos granulomas, que são formados na tentativa do organismo de combater a infecção. No que se refere à resposta imunológica protetora contra a tuberculose, ela também é desencadeada pelos linfócitos T *Helper* 1 (Th1), que sinalizam para o recrutamento de células como macrófagos, linfócitos T citotóxicos e células NK, ativando a resposta imunológica mediada por células (ROOK; HERNANDE-PANDO, 1996; TORTORA; FUNKE; CASE, 2018b). *In vivo*, linfócitos Th1 ou Th2 agem em consenso com linfócitos CD8⁺, macrófagos, linfócitos B e algumas células estromais que coletivamente liberam dois tipos padrões de citocinas: tipo 1 (dominados pela IL-2, IL-12 e IFN- γ) e tipo 2 (dominados pela IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) (ROOK; HERNANDE-PANDO, 1996).

A partir da descoberta do HIV como causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), que infecta linfócitos T CD4⁺, aliada à alta frequência de casos concomitantes de tuberculose, foi possível definir que os linfócitos T CD4⁺ são primordiais para imunidade protetora contra a tuberculose (GELDMACHER *et al.*, 2012). Além do linfócito Th (CD4⁺), inúmeras outras células estão envolvidas na imunidade protetora. Linfócitos T CD8⁺, linfócitos T $\gamma\delta$, linfócitos T invariáveis associados à mucosa (MAIT) e linfócitos T CD1⁺ associados a outros mecanismos mediam o controle e a eliminação das micobactérias (NUNES-ALVES *et al.*, 2014).

A partir do contato com o micro-organismo, as células começam a ativar mecanismos citolíticos, como grânulos compostos por peptídeos antimicrobianos e granzinas, que podem levar à morte apoptótica da célula (TORTORA; FUNKE; CASE, 2018a). A apoptose, por sua vez, pode ter efeito positivo na eliminação da micobactéria a partir da fagocitose das células contaminadas por macrófagos que

eliminam a célula que sofreu a apoptose e todos os componentes presentes nela, sem que haja a fuga do micro-organismo (BEHAR; DIVANGAHI; REMOLD, 2010).

A eliminação dos macrófagos ocorre através da ativação de linfócitos T CD8⁺, também chamados de linfócitos T citotóxicos (CTLs). Para isso, existem três maneiras de ativação: exocitose de grânulos citotóxicos que possuem proteínas – perforina, granulísina e granzina – que levam à lise e apoptose da célula-alvo (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008); FAS (CD95) e FAS ligante (CD95L), que são proteínas de membrana que mediam a morte celular sinalizada por TNF (TURNER *et al.*, 2001). A eliminação dos macrófagos infectados está associada à redução da viabilidade da bactéria (BEHAR; DIVANGAHI; REMOLD, 2010). Isso ocorre porque quando a célula infectada sofre o engolfamento por outra célula, processo chamado de esferocitose, a rápida união do esferossomo com os lisossomos leva à morte de *M. tuberculosis* (NUNES-ALVES *et al.*, 2014).

3.1.3.2 Imunidade humoral

No que se refere à imunidade humoral, esta ocorre apenas tardiamente, pois *M. tuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa, sendo a imunidade celular a mais efetiva para evitar a multiplicação do micro-organismo e sua disseminação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2018b). Se, apesar dos mecanismos e células utilizados pela resposta imunológica inata, *M. tuberculosis* se estabiliza dentro de um macrófago e consegue produzir os elementos necessários para sua multiplicação, parte desses antígenos será apresentada aos linfócitos T e B. Quando essa interação ocorre, as células B se diferenciam e dão origem à expansão clonal e à produção de anticorpos contra o agente (POLLOCK; NEILL, 2002).

3.1.3.3 Citocinas

As citocinas desempenham um papel determinante na imunidade contra a infecção por *M. tuberculosis*. Fatores como a IL-1 e vitaminas podem agir em sinergismo com as citocinas produzidas pelos linfócitos T, enquanto TNF pode levar à apoptose celular. O IFN- γ é uma das citocinas envolvidas na imunidade protetora contra vírus e bactérias intracelulares (FLYNN *et al.*, 1993). O IFN- γ está relacionado à ativação de macrófagos para que as células bacterianas ou vírus sejam eliminados através de alguns processos, como: síntese de óxido nítrico induzível (iNOS),

GTPases induzidas por IFN- γ , maturação e acidificação do fagossoma, autofagia e sinalização do receptor de vitamina D (NUNES-ALVES *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que, apesar de o IFN- γ ter um papel crucial no início da infecção, altos níveis desta citocina não estão relacionados à proteção, mas à progressão da doença (DIEL *et al.*, 2011). Outras citocinas como TNF, GM-CSF e IL-1 β e vitaminas (C e D) também funcionam como mediadores na ativação dos macrófagos. A IL-1 β funciona como uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos. O TNF age em sinergismo com o IFN- γ na estimulação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos, fazendo com que haja a manutenção da estrutura do granuloma e limitando a imunopatologia através da modulação da infiltração neutrofílica (FLYNN *et al.*, 1995). Já o GM-CSF é responsável por restringir o crescimento de micobactérias intracelulares e sua falta ocasiona problemas na reciclagem do surfactante, componente presente na superfície dos alvéolos (EDUARDO; BERMUDEZ; YOUNG, 1990).

Além das citocinas, as vitaminas possuem um papel importante na resposta imunológica da tuberculose. A vitamina D está envolvida com a produção da catelicidina LL-37, um importante peptídeo antimicrobiano envolvido na eliminação de *M. tuberculosis*. Através da produção da catelicidina, a vitamina D está envolvida nos processos de autofagia e na formação do fagossomo (RALPH; LUCAS; NORVAL, 2013). Além disso, deficiência de vitamina C pode atuar no desenvolvimento da tuberculose, mas seus mecanismos ainda não estão estabelecidos (VILCHÈZE; KIM; JACOBS, 2018).

3.1.3.4 Regulação da resposta imunológica

A tuberculose é uma doença crônica, podendo a lesão tecidual, decorrente da imunidade celular, levar a danos disseminados ao tecido afetado (POLLOCK; NEILL, 2002). Para que a reação imunológica não acarrete lesões teciduais extensas, existe um balanço de mecanismos pró- e anti-inflamatórios. Uma das células que participa dessa regulação é a Foxp 3⁺ (CD4⁺ CD25⁺), um linfócito T regulador, que secreta IL-10 e TNF β com o intuito de inibir alguns mecanismos inflamatórios (RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006). Por outro lado, quando o organismo enfrenta uma doença de caráter crônico, a estimulação excessiva por um mesmo antígeno leva à exaustão dos linfócitos T, que perdem gradativamente a sua função (NUNES-

ALVES *et al.*, 2014). A desregulação de mecanismos que controlam os linfócitos T pode levar à destruição excessiva do tecido afetado, o que é extremamente danoso para o indivíduo infectado (LÁZÁR-MOLNÁR *et al.*, 2010).

Os neutrófilos também possuem um papel importante na regulação dos mecanismos pró- e anti-inflamatórios. No pulmão, os neutrófilos produzem IL-1 β , TNF, defensinas, catelicidinas, lipocalinas, NADPH oxidase e superoxidase (PEDROSA *et al.*, 2000), além de participarem do processo de apresentação de antígenos para os linfócitos T para que ocorra a estimulação do sistema imunológico e o controle de micro-organismos intracelulares (BLOMGRAN; ERNST, 2011). Além disso, IFN- γ também pode atuar como limitante do processo inflamatório através de efeitos antiproliferativos, de modulação dos linfócitos T e através da inibição de neutrófilos. A diminuição do número de neutrófilos no pulmão é benéfica porque não permite o acúmulo dos mesmos no tecido pulmonar, evitando que haja uma destruição tecidual acelerada (NANDI; BEHAR, 2011).

3.1.4 Diagnóstico e Controle

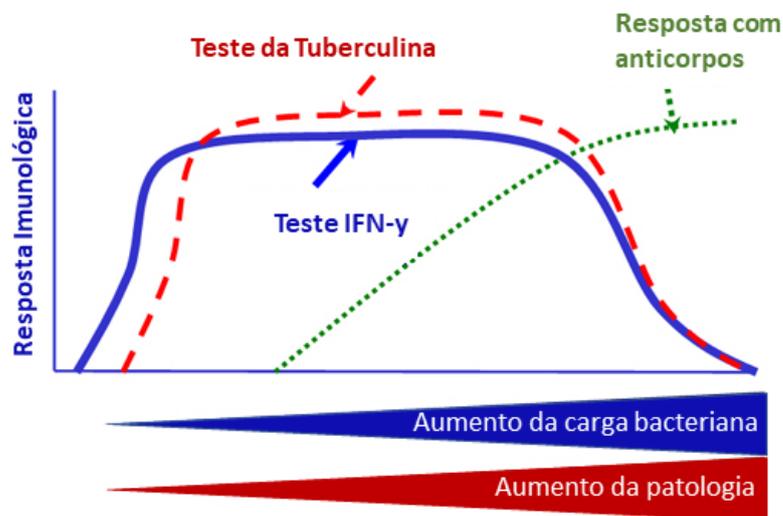
3.1.4.1 Diagnóstico *in vivo*

O diagnóstico da tuberculose *in vivo* é realizado através de testes baseados na reação de hipersensibilidade tardia, nos quais são utilizados dois antígenos: PPD_b (Derivado Proteico Purificado Bovino) e PPD_a (Derivado Proteico Purificado Aviário). Esses dois antígenos, também chamados de tuberculinas, são inoculados na intraderme e após 72 horas são verificadas as reações ao antígeno através da mensuração da espessura da pele no local em que o antígeno foi inoculado (LAGE *et al.*, 2006). É relevante destacar que o diagnóstico por meio da tuberculina é uma ferramenta importante na identificação de animais infectados, apesar de alguns autores afirmarem uma grande variabilidade quanto aos valores de sensibilidade e de especificidade do teste (COUSINS; FLORISSON, 2005). Este método, no entanto, está disponível apenas para algumas espécies, como bovinos, suínos e cervídeos (COUSINS, 2018).

Outra forma de realizar o diagnóstico de tuberculose *in vivo* é por meio de testes sorológicos. Assim, técnicas como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para detecção de IFN- γ ou de anticorpos podem ser utilizadas pela maioria dos laboratórios (COUSINS, 2018). A quantificação de IFN- γ detecta a infecção em estágios iniciais, estando relacionada à resposta imunológica celular. Já, o ELISA

indireto para detecção de anticorpos é capaz de identificar a infecção em estágios avançados da doença, quando há a formação de anticorpos (POLLOCK; NEILL, 2002) (Figura 3).

Figura 3 – Resposta imunológica da tuberculose e melhores testes a serem usados.



A resposta imunológica da tuberculose é caracterizada inicialmente pela produção de IFN-γ e posteriormente pelo aumento na produção de anticorpos, conforme ocorre concomitantemente o aumento da carga bacteriana e das lesões ligadas à doença. Fonte: Adaptado de Pollock e Neill (2002).

3.1.4.2 Diagnóstico *post-mortem*

Com base na “Classificação dos Agentes Etiológicos baseado no Grau de Risco”, *M. bovis* e as outras espécies do complexo *M. tuberculosis* integram o grupo de risco III, juntamente com outros microrganismos capazes de infectar através de aerossóis, estando associados a doenças sérias ou letais em humanos, porém possuindo formas de prevenção e tratamento (ABSA, 2020). Com isso, o processamento das amostras para o diagnóstico de tuberculose deverá obedecer às regras de biossegurança aplicadas para cada método de diagnóstico.

As amostras oriundas de animais possivelmente infectados, encaminhadas para o diagnóstico *post-mortem*, são compostas normalmente por órgãos que apresentam lesões suspeitas. Em um primeiro momento pode ser realizado o exame de microscopia direta através da coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) para visualização dos BAAR. No entanto, apenas amostras que possuem 5×10^4 células bacterianas são

passíveis de detecção através deste método (MARKEY *et al.*, 2013). Assim, amostras negativas no exame direto não devem ser consideradas a fim de determinar que a amostra não contenha BAAR (CARTER; WISE, 2004).

Amostras suspeitas de tuberculose também podem ser submetidas à histologia, onde é possível realizar o diagnóstico presuntivo a partir da visualização de algumas características como: necrose caseosa, mineralização, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e macrófagos. Devido ao caráter paubacilar da lesão da tuberculose animal, microrganismos álcool ácido-resistentes também podem não ser observados neste método (COUSINS, 2018).

Para o isolamento bacteriano, considerado método padrão-ouro para diagnóstico da tuberculose, é exigido Nível 3 de biossegurança (THOEN; STEELE; GILSDORF, 2006). O método de descontaminação utilizado por muitos laboratórios é o método de Petroff, que consiste de maceração do tecido, adição de hidróxido de sódio (2% a 4%) para descontaminação da amostra – já que *M. bovis* é resistente frente a este composto –, neutralização do pH e posterior inoculação em meios seletivos (OLIVEIRA, 2012). Os meios amplamente utilizados para o isolamento de *M. bovis* são baseados em formulações que possuem ovos em sua maior parte e inibidores para fungos e outras espécies bacterianas Gram-positivas e negativas, como Verde Malaquita, Cristal Violeta e antimicrobianos. Os meios mais utilizados na Micobacteriologia Veterinária são Lowestein-Jensen e Stonebrink. *M. bovis* cresce melhor em meios que possuem piruvato de sódio em sua composição, como o meio Stonebrink, enquanto pode ser inibido em cultivo primário pela adição de glicerol aos meios de cultura. Assim, o meio Lowestein-Jensen quando aplicado para isolamento de *M. bovis* não utiliza glicerol em sua composição. O glicerol por sua vez é considerado um fator nutricional necessário para o crescimento de *M. tuberculosis*, *M. avium* e outras micobactérias atípicas (COUSINS, 2018).

M. bovis produz colônias consideradas disgônicas, isto é, pequenas, úmidas e quebradiças, enquanto *M. tuberculosis* produz colônias eugônicas, isto é, rugosas e resistentes. As duas espécies demoram cerca de 3 a 8 semanas para formarem colônias e podem ser classificadas a partir de métodos bioquímicos e de técnicas moleculares (APÊNDICE A) (MARKEY *et al.*, 2013). Alguns testes bioquímicos utilizados para a diferenciação das espécies *M. bovis* e *M. tuberculosis* são a utilização de glicerol para o crescimento, produção de niacina, pirazinamidase, urease, redução de nitrato e inibição por TCH (BRASIL, 2008). No entanto, com a

popularização dos métodos moleculares, têm-se preferência pela confirmação molecular do isolado.

Além dos testes anteriormente citados para o diagnóstico da tuberculose animal, podem ser utilizadas técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), técnica aplicada a partir do DNA extraído do tecido suspeito. No entanto, o desempenho dos testes moleculares é menor quando comparado a outros testes, podendo levar a uma maior taxa de resultados falso-negativos. Apesar disso, a PCR é uma técnica específica, podendo gerar resultados de forma mais rápida e segura, pois não há necessidade do isolamento bacteriano (LOPES *et al.*, 2020).

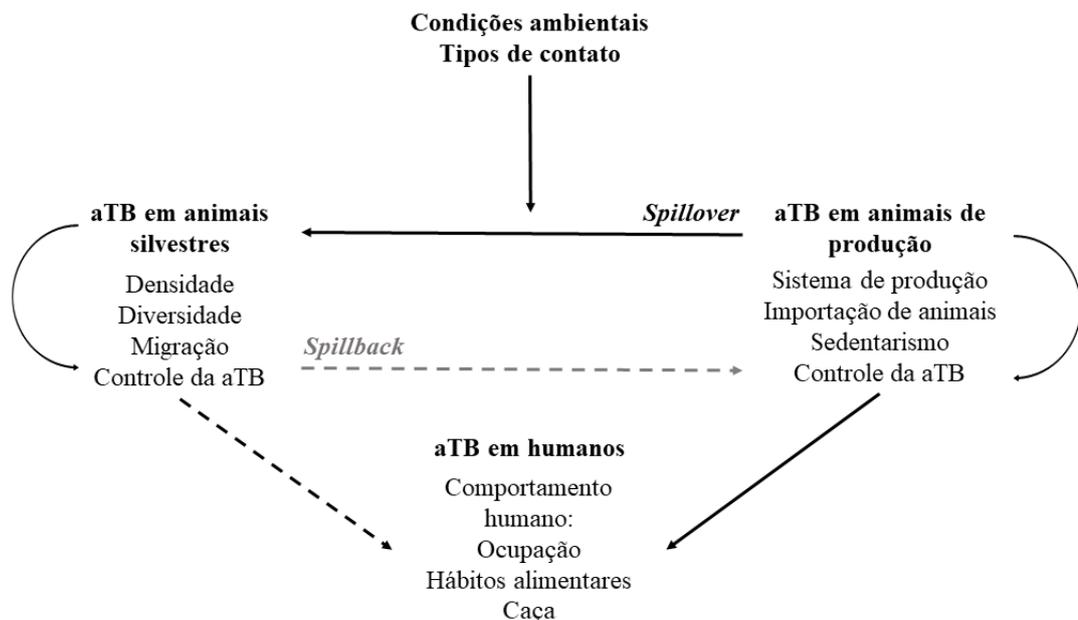
3.1.5 Tuberculose em Animais Silvestres

Inúmeras espécies de animais podem ser infectadas por *M. bovis*. Algumas espécies silvestres, exóticas ou nativas, da América do Norte (veado da cauda-branca), América do Sul (suídeos asselvajados), Europa (texugo e javali), África, Austrália (suídeos asselvajados e búfalos) e Nova Zelândia (cusu comum e furões) são caracterizadas por albergarem *M. bovis* e apresentarem risco de transmitir a bactéria para animais de produção (CORNER, 2006; GORTÁZAR *et al.*, 2012). No Brasil, Maciel *et al.* (2018) descreveram a bactéria em suídeos asselvajados, espécie que pode estar associada ao risco de transmissão a animais de produção.

Animais silvestres infectados com *M. bovis* podem ser classificados como hospedeiros de manutenção ou hospedeiros *spillover*, através de fatores envolvidos na patogenia e transmissão da doença (MORRIS; PFEIFFER, 1995). Em um hospedeiro de manutenção, a infecção pode persistir através da transmissão dentro da própria espécie ou para outras espécies. Em um hospedeiro *spillover*, a infecção não persistirá indefinidamente, a menos que haja a reinfeção através do contato com outra espécie infectada. No entanto, a transmissão de um hospedeiro *spillover* para outras espécies também pode ocorrer, como por exemplo, para animais de produção. Sendo assim, hospedeiros de manutenção e hospedeiros *spillover* podem agir como disseminadores da doença (CORNER, 2006). Ainda, a transmissão entre espécies diferentes pode ser denominada de *spillover* ou *spillback* (DE GARINE-WICHATITSKY *et al.*, 2013). Quando ocorre a transmissão de tuberculose de animais de produção para animais silvestres e animais silvestres para humanos, as mesmas são denominadas de *spillover*. Já, quando animais silvestres transmitem a doença para animais de produção, essa transmissão é denominada de *spillback*.

Alguns fatores podem influenciar o risco de transmissão da tuberculose em animais silvestres, como a densidade e diversidade populacional, os movimentos migratórios e a presença de planos de controle da tuberculose em animais domésticos. Já, em animais de produção, fatores como sistema de produção, importação de animais e os planos de controle influenciam na transmissão da doença. Em humanos, a tuberculose zoonótica está ligada à alimentação, caça e ocupação profissional (Figura 4) (DE GARINE-WICHATITSKY *et al.*, 2013).

Figura 4 – Transmissão da tuberculose animal entre espécies silvestres, animais de produção e humanos.



Animais de produção e silvestres podem manter a tuberculose animal dentro de suas espécies. Assim como pode ocorrer a transmissão de animais silvestres para animais de produção (*spillback*) ou de animais de produção para animais silvestres (*spillover*). Fonte: Adaptado de de Garine-Wichatitsky *et al.* (2013).

3.1.5.1 Tuberculose em suídeos asselvajados

O javali (*Sus scrofa*), também conhecido como o porco selvagem ou como javaporco no Brasil, é um suídeo nativo da Eurásia, Norte da África e das Ilhas Maiores de Sonda (JAKSIC *et al.*, 2002). No Brasil, esta é uma espécie exótica invasora com alto potencial de causar prejuízos para fauna e flora silvestres, agricultura e pecuária. A espécie vive em sociedades matriarcais que são constituídas

por fêmeas inter-relacionadas e seus filhotes e, os machos adultos são geralmente solitários, exceto quando estão em período reprodutivo (GRAVES, 1984).

Além dessas características, o suídeo asselvajado é uma espécie migratória o que, aliado à alta capacidade adaptativa, faz com que os animais – uma vez que caracterizados como portadores de *M. bovis* – atuem na disseminação da tuberculose animal (BUENO *et al.*, 2010). A intervenção humana fez com que a espécie se distribuísse mundialmente e, atualmente é a espécie mamífera mais abundante e difundida do mundo, sendo considerada motivo de preocupação em diversas regiões (BARRIOS-GARCIA; BALLARI, 2012)

Por ser uma espécie exótica invasora que causa prejuízos econômicos associados aos sistemas agropecuários e danos ambientais, o controle dos javalis é autorizado no Brasil pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). Desta forma, atualmente há aproximadamente 45.000 controladores autorizados a realizar abates de javalis, sendo, a transmissão de doenças como a tuberculose, um risco ocupacional para estas pessoas. Embora, não esteja estabelecido o real risco do consumo da carne oriunda do abate dos suídeos selvagens, o consumo não é aconselhado por questões sanitárias. Além dos controladores, veterinários e pessoas que trabalham no manejo de animais de produção também estão mais expostas ao risco de contrair doenças zoonóticas.

Em alguns países, os javalis são reservatórios de *M. bovis* e outros patógenos (RISCO *et al.*, 2014). Dados de um trabalho realizado em uma reserva ambiental no Rio Grande do Sul demonstram que 23,8% dos suídeos asselvajados testados, avaliados através das técnicas de PCR e cultivo bacteriológico, estavam infectados com *M. bovis*, não sendo demonstrada ainda a infecção de outros animais através do contato com suídeos asselvajados (MACIEL *et al.*, 2018). Apesar dos animais estarem infectados com *M. bovis*, dentre os animais avaliados, a maioria não apresentava lesão macroscópica compatível com tuberculose, dado que não se repete em outros trabalhos de outras regiões do mundo nos quais foram encontrados animais com lesões disseminadas (RISCO *et al.*, 2019).

A ocorrência da infecção por *M. bovis* em suídeos asselvajados já foi descrita em inúmeros países, dentre eles: França, Espanha, Portugal, Brasil, Bulgária, Croácia, Alemanha, Hungria, Itália, Eslováquia e Reino Unido (GORTÁZAR *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2018). A frequência em que os animais, suídeos asselvajados, são descritos como infectados por *M. bovis* é diferente nos diferentes países e pode variar

conforme a metodologia de diagnóstico utilizada, por exemplo, Zanella *et al.* (2008) descreve uma frequência de 41,9% na França; Risco *et al.* (2019) descreve uma frequência de 40,8% na Espanha; e Santos *et al.* (2009) descreve uma frequência de 11,1% em Portugal.

Como a formação de granulomas pela tuberculose ocorre através da resposta imunológica, um dos fatores que pode estar relacionado à ausência de lesões é a presença de coinfeções. Coinfeções são comuns em indivíduos de diversas espécies (EZENWA; JOLLES, 2011; RISCO *et al.*, 2014), podendo tornar o hospedeiro mais suscetível a determinados tipos de doenças (PATHAK *et al.*, 2012), devido à influência na resposta imunológica individual. A presença de uma determinada doença pode aumentar ou diminuir a resposta imunológica do indivíduo frente a uma nova infecção, como ocorre em seres humanos infectados concomitantemente por HIV e *M. tuberculosis* (PAWLOWSKI *et al.*, 2012).

Neste contexto, os suídeos asselvajados já foram descritos como hospedeiros para bactérias (*M. bovis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*), vírus (Vírus da Doença de Aujeszky, Circovírus Suíno do tipo 2, Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína) (RISCO *et al.*, 2014), protozoários (*Sarcocystis miescheriana* e *Anaplasma phagocytophilum*) (COELHO *et al.*, 2015; SILAGHI; PFISTER; OVERZIER, 2014) e helmintos (*Metastrongylus* spp.) (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2013). Risco *et al.* (2019) demonstraram que a presença de *M. bovis* em secreções nasais é mais provável em animais com tuberculose generalizada e com coinfeção com *Metastrongylus* sp. e PCV2. Sendo possível que esses animais transmitissem a tuberculose animal através da via respiratória para outros animais que eventualmente entrassem em contato com os suídeos asselvajados.

3.1.6 Tuberculose animal em suínos domésticos

O suíno doméstico é uma espécie suscetível à infecção por *M. bovis*, sendo também considerada uma espécie com potencial de atuar como hospedeiro *spillover* na cadeia de transmissão da tuberculose animal; no entanto, a ocorrência de tuberculose em suínos domésticos é incomum (BARANDIARAN *et al.*, 2011). A principal via de infecção dos suínos é através da ingestão de alimentos contaminados, como leite e derivados não pasteurizados (SCHWARZ *et al.*, 2002). Sendo assim, a

maior parte de lesões granulomatosas se desenvolve nos linfonodos do sistema digestório desses animais (linfonodos mesentéricos).

Quanto ao manejo realizado para prevenção de casos de tuberculose animal em suínos de criação intensiva, a Instrução Normativa N° 19, de 15 de fevereiro de 2002 define que toda Granja de Reprodutores de Suídeos Certificada deverá ser livre de peste suína clássica, doença de Aujeszky, brucelose, tuberculose, sarna e livre ou controlada para leptospirose. Para que a tuberculose seja monitorada nessas granjas, são testados reprodutores machos e fêmeas, por amostragem, com intervalo de seis meses, em prova comparativa com tuberculina bovina e aviária. Os demais níveis de produção, como as Unidades Produtoras de Leitão e as Unidades de Creche e Terminação são monitoradas através da avaliação *post-mortem* nos abatedouros.

Quando um animal é avaliado durante o abate e suas vísceras apresentam lesões granulomatosas, a maioria dos casos é relacionada à linfadenite disseminada causada por espécies do Complexo *M. avium*, doença com maior ocorrência na cadeia produtiva suína quando comparada à tuberculose animal (STROMEROVA; FALDYNA, 2018). Portanto, *M. bovis* é pouco relacionado a lesões granulomatosas em suínos durante o abate. Dados sobre a ocorrência de tuberculose animal em suínos no Brasil são escassos, porém, em um estudo realizado no período de 2012 a 2014 em animais abatidos em abatedouros com inspeção federal, a prevalência de carcaças positivas para tuberculose foi < 0,001% (COLDEBELLA *et al.*, 2018). Além do trabalho anteriormente citado, Mori *et al.* (2019) identificou uma frequência de 0,50% dos animais avaliados positivos para infecção por *M. bovis*.

Segundo Decreto n° 9.013, de 29 de março de 2017, na quinta subseção que dispõe sobre a inspeção *post-mortem* de suídeos, em resumo, carcaças que apresentarem lesões de linfadenite granulomatosa localizadas e restritas a apenas um sítio de infecção podem ser liberadas após remoção dos tecidos afetados. Já, quando há o acometimento extenso e com o a presença de lesões disseminadas, também denominadas de apresentação generalizada da linfadenite granulomatosa, as carcaças devem ser condenadas.

Não é possível realizar a diferenciação entre lesões causadas por *M. bovis* e as espécies pertencentes ao complexo *M. avium* considerando apenas aspectos macroscópicos (BARANDIARAN *et al.*, 2015). No entanto, a maioria das lesões causadas por *M. avium* são proliferativas, raramente calcificadas e localizadas nos linfonodos submandibulares e mesentéricos. Em contraste, linfonodos afetados por

M. bovis apresentam acentuada calcificação nas lesões (NEUMANN; RAMIREZ; SCHWARTZ, 2009).

3.2 *Metastrongylus* sp.

Metastrongylus sp. pertence à Família Metastrongylidae, Ordem Strongylida, Classe Chromadorea e Filo Nematoda. O gênero *Metastrongylus* é composto por 5 espécies: *M. apri*, *M. asymmetricus*, *M. confusus*, *M. pudendotectus* e *M. salmi* (GASSÓ *et al.*, 2014), sendo *M. apri* a espécie mais frequentemente relacionada a casos de parasitismo pulmonar em suídeos asselvajados. Nesses animais, as taxas de infecção podem chegar a frequências superiores a 40% (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2013). Na Espanha, registrou-se uma prevalência de 41,1% (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2013), e em outros países como Brasil e Itália, 42,4% e 96,5% respectivamente (SEVERO *et al.*, 2020; POGLAYEN *et al.*, 2016).

A Família Metastrongylidae é composta por parasitos brancos e grandes que afetam brônquios e bronquíolos de suídeos. O gênero *Metastrongylus* é caracterizado por possuir em seu aparelho bucal, lábios trilobados; em seu aparelho sexual, espículas longas e finas com bursa copulatória desenvolvida, e nas fêmeas, o ânus próximo à vulva. Quando há a ocorrência de animais infectados por *Metastrongylus* sp., ovos com uma larva em primeiro estágio são liberados nas fezes (BOWMAN, 2014).

O ciclo biológico de parasitos do gênero *Metastrongylus* está dividido em dois estágios iniciais de vida livre e um terceiro estágio infectante. Primeiramente, a mórula se transforma em uma larva de primeiro estágio que sai do ovo em cerca de um a dois dias. Após a larva se alimentar, ela atinge a primeira muda e o segundo estágio larval ainda nas fezes. Durante a segunda muda, a larva mantém a cutícula externa do segundo estágio larval como forma de proteção até atingir o hospedeiro adequado. Com cerca de uma semana, a larva em terceiro estágio começa a migrar das fezes para gotículas de água que cobrem o solo e a vegetação para, enfim, atingir o hospedeiro adequado (BOWMAN, 2014).

O gênero *Metastrongylus* normalmente necessita de um molusco ou um anelídeo como hospedeiro intermediário para a realização da muda da larva de primeiro estágio para larva de terceiro estágio infectante. A infecção do hospedeiro definitivo ocorre quando o mesmo ingere lesmas ou minhocas infectadas com o terceiro estágio larval. A migração do parasito do intestino para o pulmão ocorre

através do sistema linfático, e muitas larvas podem migrar através do fígado causando hepatite focal (MAXIE, 2015).

O gênero *Metastrongylus* era considerado importante para saúde dos suínos domésticos antes da intensificação dos sistemas produtivos e a consequente eliminação do hospedeiro intermediário, além do advento dos compostos anti-helmínticos. Atualmente, animais infectados com *Metastrongylus* sp. podem ser tratados com os fármacos Febendazol, Levamisol ou Ivermectina (BOWMAN, 2014).

3.2.1 Resposta imunológica

A imunidade protetora contra helmintos está geralmente relacionada a um aumento do número de eosinófilos circulantes (eosinofilia), aumento na produção de Imunoglobulinas E (IgE), aumento no número de mastócitos, e hiperplasia de células caliciformes (ANTHONY *et al.*, 2007). Apesar da reação imunológica a infecções por helmintos geralmente induzir a um mesmo padrão de resposta celular e humoral, ela depende da espécie de helminto envolvido na infecção (MOREAU; CHAUVIN, 2010).

A resposta imunológica envolvida no controle das doenças parasitárias causadas por helmintos é caracterizada por uma resposta tipo 2 que envolve principalmente a ativação do linfócito Th2. Essa resposta é caracterizada por envolver os sistemas inato e adaptativo da imunidade, aumentando os níveis de interleucina 4 (IL-4) e outras citocinas como IL-5, IL-9, IL-13, IL-17, IL-21 e IL-25, ativando e aumentando o número de linfócitos CD4⁺ Th2, plasmócitos secretores de IgE, eosinófilos, mastócitos e basófilos (SALGAME; YAP; GAUSE, 2013). A produção de IL-5, IL-9, IL-13 e IL-21, por sua vez, pode regular negativamente respostas tipo 1 (Th1) associadas a infecções causadas por vírus e bactérias (MOREAU; CHAUVIN, 2010).

Durante a infecção por *Metastrongylus* spp. pode ocorrer a formação de granulomas, estando associada inicialmente a uma resposta inflamatória do tipo 1 (Th1). A formação do granuloma é a tentativa de o hospedeiro limitar a migração das larvas e a deposição de ovos. Após a resposta inicial (Th1), há a transição para a resposta tipo 2 (Th2). Porém, quando ocorre falha na segunda resposta, há aumento da inflamação podendo ser prejudicial ao hospedeiro (ANTHONY *et al.*, 2007). Os granulomas formados normalmente são bem definidos e compostos por eosinófilos,

macrófagos, linfócitos e matriz de tecido conjuntivo fibroso (STADECKER *et al.*, 2004), não sendo confundíveis com os granulomas de tuberculose.

Durante a resposta imunológica tipo 2 contra helmintos, há também a ativação de macrófagos (ANTHONY *et al.*, 2007). Os macrófagos ativados parecem ter algumas funções como a modulação da resposta imunológica, cura e resistência à invasão do parasito (ANTHONY *et al.*, 2007). Os eosinófilos, componentes da segunda linha de defesa da imunidade inata, migram para o sítio de infecção para a liberação das proteínas granulares secundárias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2018a). Uma das principais funções dos eosinófilos é ajudar no remodelamento tecidual após a lesão, ajudando, assim, o processo de cura do tecido após o dano (LEE; LEE, 2005).

Mastócitos e basófilos também possuem papéis importantes na infecção por helmintos. Basófilos e eosinófilos liberam IL-4 quando ativados, sugerindo sua ligação à resposta imunológica do tipo 2 (MIN *et al.*, 2004). Os mastócitos, apesar de não serem circulantes como os basófilos e eosinófilos, possuem um papel importante associado aos tecidos periféricos e respondendo imediatamente após a invasão tecidual (ANTHONY *et al.*, 2007).

3.3 Coinfecções em suídeos asselvajados associadas a tuberculose animal

A ocorrência de coinfecções pode influenciar a resposta imunológica de um indivíduo (SALGAME; YAP; GAUSE, 2013). As coinfecções são comuns em indivíduos de várias espécies, sendo caracterizadas pela simultaneidade de dois ou mais patógenos em um hospedeiro (ALIZON, 2013). A ocorrência de coinfecções pode tornar o hospedeiro mais suscetível a algumas doenças, pois pode influenciar a resposta imunológica do indivíduo a um desafio imunológico (PATHAK *et al.*, 2012). Um exemplo é a relação entre a coinfecção de *Fasciola hepatica* e *M. bovis* em bovinos, que é capaz de diminuir a acurácia de testes diagnósticos (BYRNE *et al.*, 2019; CLARIDGE *et al.*, 2012).

Como detalhado anteriormente, as lesões granulomatosas da tuberculose são resultado da resposta imunológica do hospedeiro (POLLOCK; NEILL, 2002) e ocorre quando os linfócitos T detectam macrófagos infectados e liberam uma série de citocinas e quimocinas. A liberação dessas substâncias leva ao recrutamento de macrófagos, neutrófilos e células B para o local onde será formado o granuloma (SAUNDERS *et al.*, 2005). Os mecanismos imunológicos envolvidos no controle das coinfecções estão ligados à regulação positiva e/ou regulação negativa,

simultaneamente, de alguns padrões de resposta imunológica. Isso ocorre na coinfeção por helmintos e patógenos bacterianos, onde a resposta imunológica do organismo contra os helmintos (padrão de resposta Th2) pode diminuir os mecanismos ativados contra a infecção bacteriana (padrão de resposta Th1) por meio da produção de interleucinas como IL-4, IL-13, IL-21 e IL-25 (ANTHONY *et al.*, 2007).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que javalis no Brasil estavam infectados com *M. tuberculosis* e a maioria deles não apresentava lesões macroscópicas compatíveis com tuberculose (MACIEL *et al.*, 2018). Como a formação dos granulomas da tuberculose ocorre por meio da resposta imunológica, um dos fatores que pode estar relacionado à ausência de lesões em alguns animais pode ser a presença de coinfeções.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento sobre a ocorrência de tuberculose em suídeos domésticos e asselvajados no Rio Grande do Sul.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Avaliar a frequência de tuberculose animal em suídeos asselvajados e caracterizar patologicamente a doença;

4.2.2. Avaliar a frequência de *Metastrongylus* spp. em suídeos asselvajados;

4.2.3. Avaliar se há correlação entre a ocorrência de *Metastrongylus* spp. e ausência de lesões macroscópicas em suídeos asselvajados com tuberculose animal no Estado do Rio Grande do Sul;

4.2.4. Avaliar potenciais fatores de risco associados à ausência de lesões macroscópicas em suídeos asselvajados com tuberculose animal;

4.2.5. Descrever a ocorrência de um surto de tuberculose animal em suínos domésticos de criação intensiva no Rio Grande do Sul.

1 **5. ARTIGO CIENTÍFICO I**

2 Este artigo foi submetido à revista científica *Comparative Immunology, Microbiology*
3 *and Infectious Diseases*, estando formatado em acordo com as instruções da revista. A versão
4 presente na dissertação poderá apresentar diferenças em relação à versão publicada na revista,
5 devido às revisões requeridas pela revista realizadas após a data de homologação da
6 dissertação.

7
8 **INVESTIGATION OF *Mycobacterium bovis* AND *Metastrongylus* sp. CO-INFECTION**
9 **AND ITS RELATIONSHIP TO TUBERCULOSIS LESIONS' OCCURRENCE IN**
10 **WILD BOARS**

11
12 **SHORT TITLE: *M. bovis* AND *Metastrongylus* sp. CO-INFECTION IN WILD BOARS**

13
14 Bruna Correa Lopesa,b; Marina Roth Vidaletti; Márcia Regina Loikoc, Juliana da Silva
15 Andradea, Anna Luiza Gisler Maciela, Rovaina Laureano Doylea, Angélica Cavalheiro
16 Bertagnollia, Rogério Oliveira Rodriguesa, David Driemeierb, Fabiana Quoos Mayera*

17 *Corresponding Author: Tel +55 51 3481 3711 E-mail: bimmayer@gmail.com

18
19 ^aCentro de Pesquisa em Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor,
20 Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Secretaria da Agricultura, Pecuária e
21 Desenvolvimento Rural, Estrada Do Conde, 6000 - Sans Souci, 92990-000, Eldorado do Sul,
22 Rio Grande do Sul, Brasil.

23 ^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária,
24 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090 - Agronomia,
25 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

26 ^cFeevale, Universidade Feevale, Av. Edgar Hoffmeister, 600 - Zona Industrial Norte, Campo
27 Bom, Rio Grande do Sul, Brasil.

28
29 Bruna Correa Lopes: brunalopesveterinaria@gmail.com

30 Marina Roth Vidaletti: marina_vidaletti@hotmail.com

31 Márcia Regina Loiko: marcialoiko@feevale.br

32 Juliana da Silva Andrade: julianandrademedvet@hotmail.com

33 Anna Luiza Gisler Maciel: annaluizag.maciela@gmail.com

34 Rovaina Laureano Doyle: rovainadoyle@gmail.com

35 Angélica Cavalleiro Bertagnolli: angelbertagnolli@gmail.com

36 Rogério Oliveira Rodrigues: rogerrodriguesvet@gmail.com

37 David Driemeier: ddriemeier@gmail.com

38

39 **Abstract**

40 Animal tuberculosis (aTB) is a zoonotic disease characterized by granulomatous lesions on
41 affected tissues, occurring as a consequence of immunological response to infection.
42 *Mycobacterium bovis*, the main causative agent of aTB, was investigated in Brazilian wild
43 boars with 37.7% (29/77) positivity. Among these animals, most had no macroscopic
44 tuberculosis-like lesions (89.6%; 26/29). The existence of co-infections, which may alter an
45 individual's immune response to an immunological challenge, could influence the formation
46 of tuberculosis lesions. Therefore, we investigated *Metastrongylus* sp. and aTB co-infection to
47 seek an explanation for the absence of macroscopic lesions in aTB. Of the tested animals,
48 77.9% (60/77) had *Metastrongylus* sp., however, there was no association between its
49 occurrence and the pattern of aTB lesions. The absence of tuberculous lesions in infected
50 animals is worrisome, especially to hunters who handle their carcasses, potentially assuming
51 that the animal is healthy. Studies evaluating other possibilities that can explain the absence of
52 lesions in infected animals should be carried out to better understand these findings.

53 **Keywords:** nematode, bovine tuberculosis, swine, mixed infections, zoonosis, parasite.

54

55 **1. Introduction**

56 Animal tuberculosis is caused mostly by *M. bovis*, which leads to a chronic infectious
57 disease affecting many species of wild and domestic mammals [1]. Wild boars have been
58 demonstrated in several studies worldwide, and even in Brazil, as hosts for *M. bovis* [2].
59 Tuberculosis (TB) causes the development of granulomatous lesions, which may or may not
60 be disseminated. The granuloma formation occurs when neutrophils, monocyte-derived
61 macrophages, Natural Killer cells, and T-cells detect chemokines produced by infected
62 alveolar macrophage and pneumocytes, which further promote inflammation and tissue
63 remodeling [3].

64 Recently, our group demonstrated that wild boars from Brazil were infected with *M.*
65 *bovis* and most of the evaluated animals did not have macroscopic lesions compatible with
66 tuberculosis [2]. As the formation of tuberculous granulomas occurs due to immune response,
67 one of the factors that may be related to the absence of lesions is the presence of co-

68 infections. Co-infections are common in individuals of several species [4] and are
69 characterized by the simultaneous existence of two or more pathogens in a host [5]. The
70 occurrence of co-infections makes the host more susceptible to some particular types of
71 diseases because it can influence the host's immune response to an immunological challenge
72 [6]. One example is the relationship between *Fasciola hepatica* and *M. bovis* co-infection in
73 cattle, which diminishes the accuracy of immunodiagnostic tests [7,8].

74 Co-infections can occur in wild boars, which have already been described as hosts for
75 numerous infectious agents such as bacteria, viruses [9], protozoa [10], and helminths [11].
76 Recently, a correlation between co-infection of *Metastrongylus* sp. and Porcine Circovirus
77 Type 2 with the severity of tuberculosis lesions in wild boars from Spain was demonstrated
78 [12]. *Metastrongylus* sp. is a nematode responsible for pulmonary parasitism in swine, with
79 *M. apri* the most common species of *Metastrongylus* that causes infections in wild boars [13].
80 This parasite may influence the immune response to tuberculosis. Thus, the objectives of the
81 present study were (1) to evaluate the frequency of *M. bovis* infections in wild boars and the
82 occurrence of aTB lesions; (2) to evaluate the frequency of *Metastrongylus* sp. infections in
83 wild boars; (3) to evaluate whether there is a correlation between *Metastrongylus* sp. with
84 tuberculosis and the occurrence of macroscopic TB-like lesions; and (4) to evaluate potential
85 factors associated with the absence of gross lesions in wild boars infected with *M. bovis*.

86

87 **2. Methods**

88 *2.1. Sampling*

89 Samples were collected from 77 wild boars hunted in Barra do Ribeiro (n = 72),
90 Eldorado do Sul (n = 4) and Encruzilhada do Sul (n = 1) cities, all located in the state of Rio
91 Grande do Sul (Figure 1). They were collected between October 2013 and November 2019
92 and data including sex, age, weight, and season were also collected. Part of the sample (n =
93 61) was collected in previous study [2] and the other was collected by trained hunters using
94 personal protective equipment. Each sample was excised and placed into sterile packets and
95 sent to the laboratory. The animals were hunted with IBAMA authorization n° 723418 and the
96 project is approved by SISBIO 28741745 and local ethics' committee CEUA/IPVDF n°
97 10/13.

98

99 *2.2. Evaluation of Metastrongylus sp. infection*

100 The presence of *Metastrongylus* sp. was evaluated through the macroscopic
101 examination (Figure 2) of the 77 lungs and additional histological analysis of 61 lung
102 samples. Freshly collected samples were clarified with acetic acid followed by lactophenol for
103 genus confirmation according to Bowman [14], which describes that *Metastrongylus* sp. is a
104 large white parasite of the bronchi and bronchioles of swine and present some characteristics,
105 like: a mouth flanked by a pair of trilobed lips; long and thin spicules; a developed bursa; and
106 in females the vulva close to the anus. The helminthes measurement was performed through
107 visualization of fresh samples of the nematode and subsequent evaluation with a calibrated
108 microscope. Additionally, some samples were measured using histology samples with a
109 calibrated microscope. Histological analysis was performed following standard procedures for
110 identification of the nematodes and associated microscopic lesions. The histological sections
111 were stained with haematoxylin and eosin and evaluated under an optical microscope under
112 400 X magnification. The samples in which the parasite was visualized were classified as
113 positive.

114

115 2.3. Evaluation of *M. bovis* infection

116 A total of 585 tissue fragments (lungs, lymph nodes, liver, spleen and kidney) from
117 the 77 animals were submitted to DNA extraction by the Phenol-Chloroform method [15].
118 DNA was quantified on a spectrophotometer (L-quant, Loccus Biotechnology, Brazil) and
119 concentration adjusted to 100 ng/uL. As internal control, a PCR targeting a segment of
120 mammals' *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* gene (*Gapdh*) was performed as
121 previously described [16]. The extracted DNA was submitted to PCR specific for *M. bovis*
122 [17] and animals were considered aTB-positive if *M. bovis* DNA was detected in at least one
123 tissue. The conditions of PCR reactions are described in Table 1. The amplicons were
124 submitted to electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide and
125 visualized under UV light. Positive and negative controls were included in each reaction.
126 Additionally, macroscopic evaluation was performed in 66 animals, TB-like lesions were
127 defined as a granuloma characterized by multifocal to coalescent nodular areas with variable
128 size, white to yellowish, firm with caseous appearance.

129

130 2.4. Statistical analysis

131 Statistical analyzes were performed using the software SPSS v. 22 (IBM Statistics).
132 Two variables were evaluated as dependent: (i) Tuberculosis infection and (ii) Tuberculosis

133 infection plus gross TB-like lesions absence. The independent variables included
134 *Metastrongylus* infection, sex, weight, age, season and granulomatous lesions. The weight
135 was categorized by age group as follows: animals that were on average ± 1 standard deviation
136 (sd) were considered as normal weight. Animals with more than 1 sd above the mean were
137 considered to be overweight and animals with more than 1 sd or below the average were
138 considered to be underweight. The associations were tested through Chi-square or Fisher's
139 exact test, depending on whether the variables met the assumptions needed for the Chi-square
140 test, and were considered significant if $P < 0.05$.

141

142 3. Results

143 Of the tested animals, 37.7% (29/77) had at least one organ with detectable *M. bovis*
144 DNA. Of these, only 10.3% (3/29) presented with gross TB-like lesions (Figure 3A).
145 Interestingly, a higher proportion of positive tissues were found in the kidneys (15.7%; 8/51),
146 followed by lymph nodes (9.7%; 31/319) and spleen (9.7%; 7/72). The liver had 4.5% (3/67)
147 and the lungs 2.6% (2/76) of positive samples.

148 Regarding *Metastrongylus* sp. infection, in 77.9% (60/77) of the evaluated animals,
149 the nematode was seen through macroscopic evaluation, with histological confirmation in
150 60.6% (37/61) (Figure 3B). The identified helminths were 2.5 to 3 cm long, with a claviform
151 esophagus, 6 oral papillae, and long filiform spicules measuring between 10 to 12
152 micrometers in diameter in males. The histological alterations related to *Metastrongylus* sp.
153 included the presence of intraluminal nematodes and eggs in the bronchi and bronchioles. The
154 nematodes were 290-380 micrometers in diameter and showed a thin cuticle surrounding a
155 body cavity and with an intestinal tract, ovaries, and uterus. There was moderate peribronchial
156 and peribronchiolar infiltration of eosinophils, lymphocytes, and plasma cells. Multifocal
157 areas of congestion, emphysema, edema, and bronchus-associated lymphoid tissue
158 hyperplasia were also observed. Moreover, some samples contained parasites, but no changes
159 were observed in the adjacent tissue.

160 Among the animals infected with *M. bovis*, *Metastrongylus* sp. was present in 82.7%
161 (24/29). However, no statistically significant association was observed (P -value = 0.573)
162 (Figure 3C). There was also no association between the absence of macroscopic TB-like
163 lesions in the animals infected with *M. bovis* and *Metastrongylus* sp. (P -value = 0.545) (Table
164 2). The only significant association observed was between being underweight and absence of
165 lesions in animals with tuberculosis (Table 2).

166

167 **4. Discussion**

168 Wild boars are described as *M. bovis* reservoirs in several countries worldwide from
169 Europe to South America [12,18,19]. In the present study, which was carried out in Brazil, *M.*
170 *bovis* was detected in 37.7% (29/77) of the evaluated animals. The occurrence of tuberculosis
171 in wild boars and other wild species interferes in the management of tuberculosis in domestic
172 species such as cattle [20]. This is because they may be involved in the transmission and/or
173 maintenance of the infection [21]. In Brazil, bovine tuberculosis is an endemic disease and
174 the data on its occurrence in wild species may help improve control and eradication programs
175 [22]. Currently, there are 6,439,619 cows in operation distributed among 331,723 farms in the
176 Rio Grande do Sul, which presents with intensive and extensive systems of production, with
177 the prevalence of bovine tuberculosis estimated at 2.8% [23], making the contact between
178 wild animals and cattle in these systems possible. Accordingly, it was observed that some
179 bovine tuberculosis-positive farms also registered the presence of wild animals in their
180 properties [23].

181 *M. bovis* infection normally results in a macroscopic lesion named tuberculous
182 granuloma, which is formed by the cellular immune response against this intracellular
183 pathogen. However the absence of lesions is described in a wide range of species [24]. In this
184 study, macroscopic TB-like lesions were only detected in 10.3% (3/29) of wild boars infected
185 with *M. bovis*, which is lower than in animals from other countries [18,19,25]. The occurrence
186 of infection in animals without lesions may be overlooked in studies that base their sampling
187 on the lesions' findings. In the present study, since all the evaluated tissues were subjected to
188 PCR, it was possible to identify *M. bovis* even in tissues without lesions. This result
189 represents concerns especially related to occupational exposure of hunters, who may presume
190 carcasses to be healthy. In Brazil, wild boar hunting was authorized by the Brazilian Institute
191 of Environment and Renewable Natural Resources in 2013 and currently, there are almost
192 45,000 registered hunters. Therefore, the sanitary education for these people and further
193 studies evaluating *M. bovis* transmission of wild boars to humans still needs to be assessed.

194 Since the tuberculous lesions are result of the host immune response, their absence
195 may be related to the occurrence of co-infections. The granuloma formation occurs when T-
196 cells detect infected macrophages and release a series of cytokines and chemokines, which
197 leads to the recruitment of macrophages, neutrophils, and B-cells to the site of infection
198 [26,27]. The immune mechanisms involved in the control of co-infections are linked to

199 simultaneous up and/or downregulation, of some patterns of the immune response. This
200 occurs in co-infection of helminths and bacterial pathogens, in which the immune response
201 against the helminth (T-helper 2 response pattern) could downregulate the immune
202 mechanisms against bacterial infection (T-helper 1 response pattern) through the production
203 of interleukins [28]. Thus, some authors have claimed that there is a relationship between the
204 pathogenesis of tuberculosis and the presence of concomitant infections [9, 12, 29]. One
205 example is the *F. hepatica* and *M. bovis* co-infection in cattle, which was shown to interfere in
206 in vivo immunodiagnostic tests efficacy [30]. Other studies have also claimed that coinfection
207 is linked to tuberculosis progression [9,29]. However, in the present study it was not possible
208 to verify any association between the lesion presentation in animals with *M. bovis* and
209 *Metastrongylus* sp. infection. This result could be related to the high frequency of
210 *Metastrongylus* sp. in wild boars with or without tuberculosis (82.7% and 75.0%,
211 respectively). In addition, it is important to point out that, besides co-infections,
212 granulomatous lesions are not expected to occur in all infected animals [31,32]. Factors such
213 as the initial infection stage or lack of disease progression may also be involved in this
214 presentation [24].

215 Additionally, there was no association between most of evaluated factors, i.e., age,
216 sex, and season of collection, with *M. bovis* infection or *M. bovis* infection without visible
217 lesions (Table 2). Like other studies, the occurrence of animal tuberculosis in wild boars was
218 distributed among all evaluated ages and sexes [12,18]. However, it is important to highlight
219 that the underweight condition was associated with the absence of lesions in positive animals.
220 This association was also found in cattle [33,34]. Although tuberculosis is associated with
221 poor body condition, the cause-effect relationship is not defined. It is elucidated that animals
222 with tuberculosis present with weight loss, however, it is not clear whether animals with low
223 body weight are more prone to disease development or not [33]. Moreover, the animal weight
224 could be influenced by other variables including weather, food availability, or even individual
225 behavior; therefore, this result must be considered sparingly.

226 Finally, this study showed *Metastrongylus* sp. infection in free-living wild boars. This
227 is an important parasitic disease in these animals, which causes respiratory problems due to
228 extensive tissue damage [35] and possible viral and bacterial opportunistic infections [9]. The
229 frequency of infection observed in the evaluated animals (77.9%) was higher than observed in
230 captive and free wild boars from different regions of Brazil [35–37]. Although
231 *Metastrongylus* sp. infection was extinguished in intensive swine farms, free and captive wild

232 boars continue to present this pulmonary nematode infection due to their constant contact with
233 the intermediate host of the parasite.

234

235 **5. Conclusion**

236 The results of this study show that Brazilian wild boars can be infected with *M. bovis*
237 and *Metastrongylus* sp. and that there was no association between co-infection with these
238 agents and the absence of tuberculous lesions in aTB-positive animals. The absence of lesions
239 in animals with tuberculosis is a concern related to occupational exposure, especially for
240 hunters who handle wild boar carcasses. Thus, the results highlight the importance of
241 continuous surveillance of tuberculosis in wild boars, which may represent threat to animal
242 and public health.

243

244 **Author Contributions**

245 Bruna Correa Lopes: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data Curation,
246 Writing (Original draft preparation), and Visualization. Marina Roth Vidaletti: Methodology
247 and Investigation. Márcia Regina Loiko: Methodology, Investigation, Data Curation, and
248 Writing (Review and Editing). Juliana da Silva Andrade: Methodology, Investigation and
249 Data Curation. Anna Luiza Gisler Maciel: Methodology, Investigation and Data Curation.
250 Rovaina Laureano Doyle: Investigation, Data Curation, and Writing (Review and Editing).
251 Angélica Cavalheiro Bertagnolli: Methodology, Investigation, Data Curation, and Writing
252 (Review and Editing). Rogério Oliveira Rodrigues: Formal analysis. David Driemeier:
253 Writing (Review and Editing) and Supervision. Fabiana Quoos Mayer: Conceptualization,
254 Methodology, Investigation, Writing (Review and Editing), Resources, Funding acquisition,
255 Project administration, Visualization and Supervision.

256

257 **Acknowledgements**

258 We are grateful to Andrea Sara Dutra and Editage (www.editage.com) for English
259 language editing. The authors are grateful to Avelino Kafer and the hunting groups who
260 allowed sample collection and to Caroline Tochetto for map drawing. We also thank the
261 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to support this
262 study.

263

264 **Funding sources**

265 The authors acknowledge the financial support provided by CMPC Celulose Rio
 266 Grandense (grant n° C2017/067) and FAPERGS (grant n° 1967-2551/13-7). ALGM received
 267 a DTI scholarship by FAPERGS (grant n° 833-2551/13-5).

268

269 **Data statement**

270 The raw data of the present manuscript will be available upon request.

271

272 **References**

- 273 [1] D.V. Cousins, Chapter 3.4.6. Bovine Tuberculosis, in: OIE Terr. Man. 2018, 8th Editio,
 274 World Organization for Animal Health, 2018: pp. 1058–1074.
 275 <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/>.
- 276 [2] A.L.G. Maciel, M.R. Loiko, T.S. Bueno, J.G. Moreira, M. Coppola, E.R. Dalla Costa,
 277 K.B. Schmid, R.O. Rodrigues, S.P. Cibulski, A.C. Bertagnolli, F.Q. Mayer, Tuberculosis
 278 in Southern Brazilian wild boars (*Sus scrofa*): First epidemiological findings,
 279 Transbound. Emerg. Dis. 65 (2018) 518–526. <https://doi.org/10.1111/tbed.12734>.
- 280 [3] S. Ehlers, U.E. Schaible, The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host –
 281 Pathogen Collusion The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host – pathogen
 282 collusion, (2012). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>.
- 283 [4] V.O. Ezenwa, A.E. Jolles, From host immunity to pathogen invasion: The effects of
 284 helminth coinfection on the dynamics of microparasites, Integr. Comp. Biol. 51 (2011)
 285 540–551. <https://doi.org/10.1093/icb/icr058>.
- 286 [5] S. Alizon, Co-infection and super-infection models in evolutionary epidemiology,
 287 Interface Focus. 3 (2013). <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0031>.
- 288 [6] A.K. Pathak, C. Pelensky, B. Boag, I.M. Cattadori, Immuno-epidemiology of chronic
 289 bacterial and helminth co-infections: Observations from the field and evidence from the
 290 laboratory, Int. J. Parasitol. 42 (2012) 647–655.
 291 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.04.011>.
- 292 [7] J. Claridge, P. Diggle, C.M. McCann, G. Mulcahy, R. Flynn, J. McNair, S. Strain, M.
 293 Welsh, M. Baylis, D.J.L. Williams, *Fasciola hepatica* is associated with the failure to
 294 detect bovine tuberculosis in dairy cattle, Nat. Commun. 3 (2012).
 295 <https://doi.org/10.1038/ncomms1840>.
- 296 [8] A.W. Byrne, J. Graham, J. McConville, G. Milne, M. Guelbenzu-Gonzalo, S. McDowell,
 297 Liver fluke (*Fasciola hepatica*) co-infection with bovine tuberculosis in cattle: A

- 298 prospective herd-level assessment of herd bTB risk in dairy enterprises, *Transbound.*
299 *Emerg. Dis.* 66 (2019) 1727–1736. <https://doi.org/10.1111/tbed.13209>.
- 300 [9] D. Risco, E. Serrano, P. Fernández-Llario, J.M. Cuesta, P. Gonçalves, W.L. Garcia-
301 Jiménez, R. Martínez, R. Cerrato, R. Velarde, L. Gómez, J. Segalés, J.H. De Mendoza,
302 Severity of bovine tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in
303 wild boar, *PLoS One.* 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110123>.
- 304 [10] C. Coelho, J. Gomes, J. Inácio, A. Amaro, J.R. Mesquita, I. Pires, A.P. Lopes, M. Vieira-
305 Pinto, Unraveling *Sarcocystis miescheriana* and *Sarcocystis suihominis* infections in wild
306 boar, *Vet. Parasitol.* 212 (2015) 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.015>.
- 307 [11] Á.M. García-González, J.E. Pérez-Martín, J.A. Gamito-Santos, R. Calero-Bernal, M.A.
308 Alonso, E.M.F. Carrión, Epidemiologic study of lung parasites (*Metastrongylus* spp.) in
309 wild boar (*Sus scrofa*) in southwestern Spain, *J. Wildl. Dis.* 49 (2013) 157–162.
310 <https://doi.org/10.7589/2011-07-217>.
- 311 [12] D. Risco, R. Martínez, M. Bravo, P. Fernández Llario, R. Cerrato, W.L. Garcia-Jiménez,
312 P. Gonçalves, A. García, Ó. Barquero-Pérez, A. Quesada, J. Hermoso De Mendoza,
313 Nasal shedding of *Mycobacterium tuberculosis* in wild boar is related to generalised
314 tuberculosis and concomitant infections, *Vet. Rec.* (2019).
315 <https://doi.org/10.1136/vr.105511>.
- 316 [13] G. Poglayen, B. Marchesi, G. Dall'Oglio, G. Barlozzari, R. Galuppi, B. Morandi, Lung
317 parasites of the genus *Metastrongylus* Molin, 1861 (Nematoda: Metastrongilidae) in wild
318 boar (*Sus scrofa* L., 1758) in Central-Italy: An eco-epidemiological study, *Vet. Parasitol.*
319 217 (2016) 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.007>.
- 320 [14] D.D. Bowman, Helminths, in: *Georg. Parasitol. Vet.*, 10th ed., Elsevier Saunders, 2014:
321 pp. 122–240.
- 322 [15] K.K. Singh, M. Muralidhar, A. Kumar, T.K. Chattopadhyaya, K. Kapila, M.K. Singh,
323 S.K. Sharma, N.K. Jain, J.S. Tyagi, Comparison of in house polymerase chain reaction
324 with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in
325 granulomatous lymphadenopathy, *J. Clin. Pathol.* 53 (2000) 355–361.
326 <https://doi.org/10.1136/jcp.53.5.355>.
- 327 [16] C. Cerva, C. Bremm, E.M. dos Reis, A.V.A. Bezerra, M.R. Loiko, C.E.F. da Cruz, A.
328 Cenci, F.Q. Mayer, Food safety in raw milk production: Risk factors associated to
329 bacterial DNA contamination, *Trop. Anim. Health Prod.* 46 (2014) 877–882.
330 <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0580-y>.

- 331 [17] F.Q. Mayer, C. Cerva, D. Driemeier, C.E.F. da Cruz, M.R. Loiko, M. de M. Coppola, S.
332 Cibulski, A.C. Bertagnolli, *Mycobacterium bovis* infection in a collared peccary (*Tayassu*
333 *tajacu*): Insights on tuberculosis wild reservoirs, *Vet. Microbiol.* 160 (2012) 549–551.
334 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.033>.
- 335 [18] G. Zanella, A. Duvauchelle, J. Hars, F. Moutou, M.L. Boschioli, B. Durand, Patterns of
336 lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar, *Vet. Rec.* 163 (2008) 43–
337 47. <https://doi.org/10.1136/vr.163.2.43>.
- 338 [19] M. Vieira-Pinto, J. Alberto, J. Aranha, J. Serejo, A. Canto, M. V. Cunha, A. Botelho,
339 Combined evaluation of bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*) and red deer
340 (*Cervus elaphus*) from Central-East Portugal, *Eur. J. Wildl. Res.* 57 (2011) 1189–1201.
341 <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0532-z>.
- 342 [20] R.A. McDonald, Animal health: How to control bovine tuberculosis, *Nature.* (2014).
343 <https://doi.org/10.1038/nature13514>.
- 344 [21] P.G. Livingstone, N. Hancox, G. Nugent, G.W. de Lisle, Toward eradication: the effect
345 of *Mycobacterium bovis* infection in wildlife on the evolution and future direction of
346 bovine tuberculosis management in New Zealand, *N. Z. Vet. J.* 63 (2015) 4–18.
347 <https://doi.org/10.1080/00480169.2014.971082>.
- 348 [22] C.O. Thoen, J.H. Steele, M.J. Gilsdorf, *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and
349 Humans, Second Edi, Ames, 2006.
- 350 [23] M.R. Queiroz, A.C.M. Groff, N.D.S. Silva, J.H.H.G. Filho, M. Amaku, R.A. Dias, E.O.
351 Telles, M.B. Heinemann, J.S.F. Neto, V.S.P. Gonçalves, F. Ferreira, Epidemiological
352 status of bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, *Semin. Agrar.* 37
353 (2016) 3647–3658. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3647>.
- 354 [24] D. Gavier-Widén, M.M. Cooke, J. Gallagher, M.A. Chambers, C. Gortázar, A review of
355 infection of wildlife hosts with *Mycobacterium bovis* and the diagnostic difficulties of the
356 ‘no visible lesion’ presentation, *N. Z. Vet. J.* 57 (2009) 122–131.
357 <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36891>.
- 358 [25] M.P. Martín-Hernando, U. Höfle, J. Vicente, F. Ruiz-Fons, D. Vidal, M. Barral, J.M.
359 Garrido, J. de la Fuente, C. Gortazar, Lesions associated with *Mycobacterium*
360 *tuberculosis* complex infection in the European wild boar, *Tuberculosis.* 87 (2007) 360–
361 367. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.02.003>.
- 362 [26] J.M. Pollock, S.D. Neill, *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle, *Vet. J.*
363 (2002). <https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0655>.

- 364 [27] B.M. Saunders, S. Tran, S. Ruuls, J.D. Sedgwick, H. Briscoe, W.J. Britton,
365 Transmembrane TNF Is Sufficient to Initiate Cell Migration and Granuloma Formation
366 and Provide Acute, but Not Long-Term, Control of *Mycobacterium tuberculosis*
367 Infection, *J. Immunol.* 174 (2005) 4852–4859.
368 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4852>.
- 369 [28] R.M. Anthony, L.I. Rutitzky, J.F. Urban, M.J. Stadecker, W.C. Gause, Protective
370 immune mechanisms in helminth infection, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 975–987.
371 <https://doi.org/10.1038/nri2199>.
- 372 [29] Vanessa O. Ezenwaa, Sarah A. Budischaka, Peter Bussc, Mauricio Seguela, Gordon
373 Luikartd, Anna E. Jollese, Kaori Sakamoto, Natural resistance to worms exacerbates
374 bovine tuberculosis severity independently of worm coinfection, 118 (2021) 2015080118.
375 <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.2015080118>.
- 376 [30] A.W. Byrne, S. McBride, J. Graham, A. Lahuerta-Marin, J. McNair, R.A. Skuce, S.W.
377 McDowell, Liver fluke (*Fasciola hepatica*) co-infection with bovine tuberculosis (bTB)
378 in cattle: A retrospective animal-level assessment of bTB risk in dairy and beef cattle,
379 *Transbound. Emerg. Dis.* 66 (2019) 785–796. <https://doi.org/10.1111/tbed.13083>.
- 380 [31] D. V. Cousins, *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock, *OIE*
381 *Rev. Sci. Tech.* 20 (2001) 71–85. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1263>.
- 382 [32] B.C. Lopes, E.M. dos Reis, F.B.R. de Bitencourt, M.R. Loiko, A.V.A. Bezerra, T.S.
383 Bueno, I.T. Lape, C. Cerva, M. de M. Coppola, R.O. Rodrigues, J.E. Vargas, A.C.
384 Bertagnolli, F.Q. Mayer, A molecular strategy to optimize bovine tuberculosis post-
385 mortem diagnosis and the exposure to *Mycobacterium tuberculosis* variant bovis, *Mol.*
386 *Biol. Rep.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05718-7>.
- 387 [33] S.W. Dejene, I.M.A. Heitkönig, H.H.T. Prins, F.A. Lemma, D.A. Mekonnen, Z.E.
388 Alemu, T.Z. Kelkay, W.F. De Boer, Risk factors for bovine tuberculosis (bTB) in cattle
389 in Ethiopia, *PLoS One.* 11 (2016) 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159083>.
- 390 [34] M.F. Humblet, M.L. Boschioli, C. Saegerman, Classification of worldwide bovine
391 tuberculosis risk factors in cattle: A stratified approach, *Vet. Res.* 40 (2009).
392 <https://doi.org/10.1051/vetres/2009033>.
- 393 [35] D. Da Silva, G. Müller, Parasites of the respiratory tract of *Sus scrofa scrofa* (wild boar)
394 from commercial breeder in southern Brazil and its relationship with *Ascaris suum*,
395 *Parasitol. Res.* 112 (2013) 1353–1356. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3214-1>.

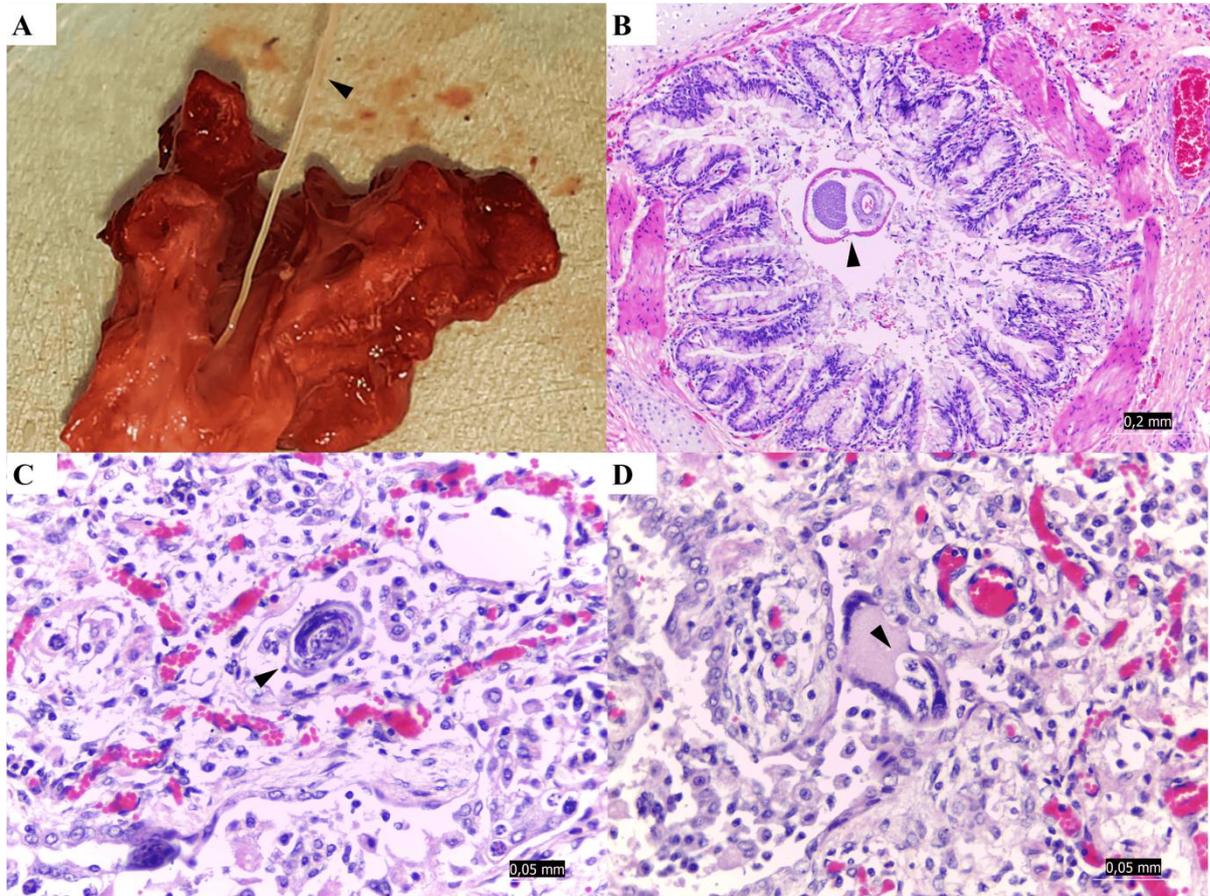
- 396 [36]D.R.T. Severo, R.A. Werlang, A.P. Mori, K.R.A. Baldi, R.E. Mendes, S.R.S. Surian, A.
397 Coldebella, B. Kramer, I.M. Trevisol, T.M.A. Gomes, V.S. Silva, Health profile of free-
398 range wild boar (*Sus scrofa*) subpopulations hunted in Santa Catarina State, Brazil,
399 Transbound. Emerg. Dis. (2020) 0–2. <https://doi.org/10.1111/tbed.13752>.
- 400 [37]R.A. Gomes, M.R. Bonuti, K. de S. Almeida, A.A. do Nascimento, Infecções por
401 helmintos em Javalis (*Sus scrofa scrofa*) criados em cativeiro na região Noroeste do
402 Estado de São Paulo, Brasil, Ciência Rural. 35 (2005) 625–628.
403 <https://doi.org/10.1590/s0103-84782005000300021>.
404
405

406 **Figure 1.** Spatial distribution of the evaluated wild boars from Brazil. The hunting sites are
407 represented by the name of the cities: Barra do Ribeiro, Encruzilhada do Sul and Eldorado do
408 Sul.



409
410
411

412 **Figure 2.** Macroscopic and histological alterations related to *Metastrongylus* sp. infection in
413 the evaluated wild boars from Brazil. A: *Metastrongylus* sp. removed from the bronchi of a
414 fresh wild boar. B: intraluminal nematodes in the bronchi; the nematodes were 290-380
415 micrometers in diameter and showed a thin cuticle surrounded by a body cavity and
416 presenting with an intestinal tract, ovaries, and uterus. C and D: Presence of eggs being
417 engulfed by cells.

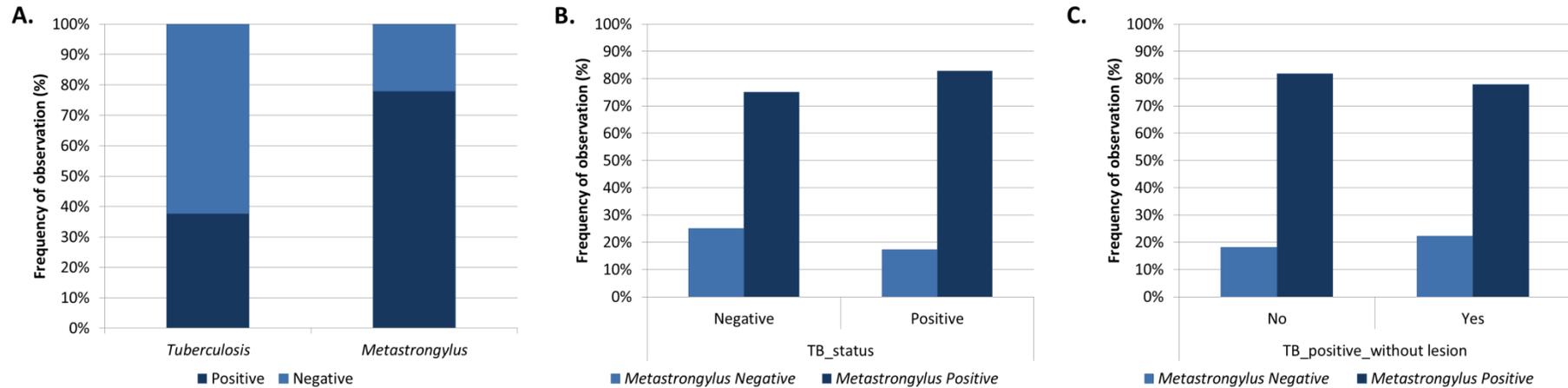


418

419

420

421 **Figure 3.** Animal tuberculosis and *Metastrongylus* sp. infection in the evaluated wild boars from Brazil. A: Frequency of aTB (37.7%; 29/77)
 422 and *Metastrongylus* sp. (77.9%; 60/77) infection. B: Frequency of *Metastrongylus* sp. infection in animals with (82.7%; 24/29) and without
 423 (75.0%; 36/48) aTB co-infection. C: Frequency of aTB infection and the absence of macroscopic lesion in animals with (77.8%; 14/18) and
 424 without (22.2%; 4/18) *Metastrongylus* sp. co-infection.



425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437 **Table 1.** Primers' sequences and PCR conditions used in the present study.

438

Target	Primers (5'-3')	Amplicon size (bp)	Cycling profile			PCR conditions		References
			Temperature	Time	Cycles	Reagent	Concentration	
<i>Gapdh</i>	Fwd: CCCATCACCATCTTCCAGG Rev: CATATTTGGCAGCTTTCTCC	550	95 °C	5 min	1 x	Buffer	1x	[17]
			95 °C	30 sec		dNTP	0.1 mM	
			60 °C	30 sec	35 x	MgCl ₂	1.5 mM	
			72 °C	30 sec		Primers	0.4 µM	
			72 °C	7 min	1 x	Taq DNA pol	1 U	
<i>M. bovis</i>	BoF: CCTTCCGCACACCGTTCAG BoR: CATCAGTGGGGACGCTACTACG	436	95 °C	5 min	1 x	Buffer	1x	[17,32]
			95 °C	30 sec		dNTP	0.1 mM	
			60 °C	30 sec	35 x	MgCl ₂	1.5 mM	
			72 °C	30 sec		Primers	0.4 µM	
			72 °C	7 min	1 x	Taq DNA pol	1 U	

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452 **Table 2.** Results of association analysis between the tested independent variables and tuberculosis infection in wild boars from Brazil. Chi-
 453 square or Fischer Exact tests were performed with residual analysis.
 454

Variable	Category	Frequency (%; 95% CI)	Tuberculosis		Tuberculosis-positive without lesion	
			Frequency (%; 95% CI)	P value	Frequency (%; 95% CI)	P value
Sex	Male	44 (59.5; 50.0 – 71.6)	15/44 (34.1; 22.7 – 45.5)	0.631	7/36 (19.4; 11.1 – 27.8)	0.251
	Female	30 (40.5; 29.7 – 48.6)	12/30 (40.0; 26.7 – 56.7)		9/27 (33.3; 18.5 – 48.1)	
Weight	Underweight	10 (15.9; 9.5 – 23.8)	7/10 (70.0; 50.0 – 90.0)	0.053	6/9 (66.7; 44.4 – 77.8)*	0.014
	Normal Weight	43 (68.2; 58.7 – 79.4)	15/43 (34.9; 23.3 – 46.5)		8/35 (22.9; 11.4 – 34.3)	
	Overweight	10 (15.9; 9.5 – 22.2)	2 /10 (20.0; 00.0 – 50.0)		1/10 (10.0; 00.0 – 30.0)	
Age	Weaner	33 (52.4; 42.9 – 61.9)	11/33 (33.3; 21.2 – 45.5)	0.648	8/30 (26.7; 13.3 – 36.7)	0.598
	Juvenile	11 (17.5; 9.5 – 25.4)	5/11 (45.4; 27.3 – 63.6)		4/10 (40.0; 20.0 – 60.0)	
	Adult	19 (30.1; 20.6 – 41.3)	8/19 (42.1; 26.3 – 57.9)		3/14 (21.4; 00.0 – 48.9)	
City	Barra do Ribeiro	72 (93.5; 88.3 – 97.4)	29/72 (40.3; 30.6 – 50.0)	0.291	18/61 (29.5; 19.7 – 41.0)	0.686
	Eldorado do Sul	4 (5.2; 1.3 – 10.4)	0/4 (00.0)		0/4 (00.0)	
	Encruzilhada do Sul	1 (1.3; 0.00- 3.9)	0/1 (00.0)		0/1 (00.0)	
Season	Summer	13 (18.6; 10.0 – 27.1)	4/13 (30.8; 15.4 – 46.2)	0.417	2/11 (18.2; 00.0 – 45.5)	0.644
	Spring	26 (37.1; 28.6 – 45.7)	11/26 (42.3; 26.9 – 57.7)		6/19 (31.6; 15.8 – 47.4)	
	Autunm	14 (20.0; 11.4 – 28.6)	8/14 (57.1; 35.7 – 78.6)		5/12 (41.7; 16.7 – 66.7)	
	Winter	17 (24.3; 15.7 – 32.9)	5/17 (29.4; 17.6 – 41.2)		4/17 (23.5; 11.8 – 35.3)	
Gross granulomatous lesion	Yes	6 (9.1; 4.5 – 15.2)	3/6 (50.0; 16.7 – 83.3)	0.373	0/6 (00.0)	0.178
	No	60 (90.9; 84.8 – 97.0)	18/60 (30.0; 20.0 – 39.6)		18/60 (30.0; 20.0 – 41.7)	
<i>Metastrongylus</i> spp.	Yes	60 (77.9; 70.1 – 85.7)	24/60 (40.0; 30.0 – 48.3)	0.573	14/50 (28.0; 18.0 – 40.0)	0.545
	No	17 (22.1; 14.3 – 29.9)	5/17 (29.4; 11.8 – 47.1)		4/16 (25.0; 12.5 – 37.5)	

6. ARTIGO CIENTÍFICO II

Este artigo foi submetido à revista científica *Ciência Rural*, estando formatado de acordo com as instruções da revista. A versão presente na dissertação poderá apresentar diferenças em relação à versão publicada na revista, devido às revisões requeridas pela revista realizadas após a data de homologação da dissertação.

TUBERCULOSIS OUTBREAK IN INTENSIVE SWINE FARMING FROM SOUTHERN BRAZIL

SURTO DE TUBERCULOSE EM SUÍNOS DE CRIAÇÃO INTENSIVA NO SUL DO BRASIL

Bruna Correa Lopes¹, Marina Roth Vidaletti², Daniel Holanda Soares³, Fernando Froner Argenta¹, Lauren Santos de Mello¹, Saulo Petinatti Pavarini¹, Fabiana Quoos Mayer^{2*} David Driemeier¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Centro de Pesquisa em Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Secretaria de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brasil.

³Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding author

E-mail: bimmayer@gmail.com

Ciência Rural, Santa Maria, v.51:11, e20200991, 2021

ISSNe 1678-4596

<http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200991>

Abstract

Mycobacterium bovis is the etiologic agent of animal tuberculosis (aTB), a neglected zoonotic disease. Animal tuberculosis can affect many species, including swine. aTB-consistent granulomas in these animals lead to carcass disposal, generating economic losses and posing risks to human health. In the present study, an aTB outbreak was identified at an intensive swine farming operation in Southern Brazil. Inspection during swine slaughter revealed aTB-suspected lesions, which were collected for diagnosis by histology, PCR, and bacterial isolation. The animals had no clinical signs of tuberculosis. Granulomatous lesions were identified in 0.73% (59/8,071) of the slaughtered swine, and were confirmed by histology. Nine samples were further examined by PCR and bacterial isolation, with 44.4% and 55.5% positive results, respectively. Data from abattoirs subjected to federal surveillance show an aTB prevalence in Brazil of <0.001%. The present data thus indicate a swine aTB outbreak in intensive breeding. Swine infection can be related to exposure to infected animals or to contaminated food or environment. Biosecurity measures must be taken to avoid aTB transmission. Although, certified swine breeding farms adopt such measures, this report indicates that constant monitoring is crucial, and greater control in swine breeding and finishing units is required to prevent outbreaks and spread of tuberculosis.

Key-words: zoonosis, one health, *Mycobacterium bovis*, PCR, pigs.

Resumo

Mycobacterium bovis é o agente etiológico da tuberculose animal (aTB), uma doença zoonótica negligenciada. A tuberculose animal pode afetar muitas espécies, incluindo suínos. Os granulomas compatíveis com a aTB nesses animais levam ao descarte de carcaças, gerando perdas econômicas e trazendo riscos à saúde humana. No presente estudo, um surto de aTB foi identificado em um sistema de criação intensiva de suínos na região Sul do Brasil. A inspeção durante um abate de suínos revelou lesões suspeitas de tuberculose, as quais foram coletadas para diagnóstico por histologia, PCR e isolamento bacteriano. Os animais não apresentavam sinais clínicos de tuberculose. Lesões granulomatosas foram identificadas em 0,73% (59/8.071) dos suínos abatidos, e foram confirmadas pela histologia. Nove amostras foram posteriormente examinadas por PCR e isolamento bacteriano, com 44,4% e 55,5% de resultados positivos, respectivamente. Dados de frigoríficos submetidos à vigilância

federal demonstram prevalência da aTB de < 0,001% no Brasil. Os dados presentes indicam, portanto, um surto de aTB em suínos de criação intensiva. A infecção em suínos pode estar relacionada à exposição a animais infectados, alimentos ou ambientes contaminados. Medidas de biossegurança devem ser tomadas para evitar a transmissão da aTB. Embora as granjas suinícolas certificadas adotem tais medidas, este relato indica que o monitoramento constante é crucial, e maior controle nas unidades de criação e terminação de suínos é necessário para prevenir surtos e disseminação da tuberculose.

Palavras-chave: zoonose, saúde única, *Mycobacterium bovis*, PCR, Suínos.

SHORT NOTE

Mycobacterium bovis causes animal tuberculosis (aTB), a neglected infectious zoonotic disease (WHO, 2010) that can affect wild and domestic species (BYRNE et al., 2019). Swine are susceptible to *M. bovis* infection, but infections in this species are uncommon compared with *M. avium* infections (COLDEBELLA et al., 2018). When granulomatous lesions are identified during carcass examinations, most lesions are related to lymphadenitis, caused by *M. avium* complex bacteria (STROMEROVA; FALDYNA, 2018). Data from abattoirs under federal surveillance show that aTB prevalence was <0.001%, and lymphadenitis prevalence was 0.81% between 2012 and 2014 in Brazil (COLDEBELLA et al., 2018).

The presence of aTB-compatible granulomas leads to partial or whole carcass condemnation, contributing to economic loss (BRASIL, 2017). Each year, 3,974 kilotons of pork are produced in Brazil and about 84% is directed to domestic markets (ABPA, 2019). Therefore, biosecurity measures during pig rearing and finishing, together with monitoring and surveillance measures must be taken to prevent infection of animals with *M. bovis*, and ensure that infected animals do not reach human consumers. This study described an outbreak of *M. bovis* in swine from production facility in Rio Grande do Sul, Brazil.

During a slaughter that occurred in February 2019 in the central region of Rio Grande do Sul State, southern Brazil, 59 swine among a total of 8,071 (0.73%) presented granulomatous lesions at post-mortem examination, these animals were approximately 4 to 5 months old. The positive animals were from three different finishing farms, but were traced to the same piglet production unit. Lesions were

found in all submandibular and pulmonary lymph nodes, and in some mesenteric lymph nodes, livers, and spleens. Lesions were grossly characterized by multifocal to coalescent nodular areas of 0.3 to 1.5 cm, white to yellowish, firm, with caseous appearance. The animals had no clinical signs of tuberculosis and had a normal body score during pre-slaughter evaluation.

Of the 59 animals, 22 were sampled, of which 29 tissues were submitted for histological diagnosis according to standard protocols. For histological analyses, fragments of the affected organs were harvested and fixed in 10% neutral buffered formalin. Thin slices were then processed and stained with Haematoxylin and Eosin (HE) and Ziehl Neelsen. Nine samples, each from a different animal, were randomly selected for PCR and bacterial isolation. For molecular analyses, DNA was extracted from fragments of affected tissues, and subjected to PCR specific to *M. bovis* as previously described (LOPES et al., 2020; MAYER et al., 2012). For mycobacterial isolation, after decontamination using the Petroff method, tissues were inoculated in Stonebrink-Leslie and Löwenstein-Jensen culture media (COUSINS, 2018). Samples were then aerobically incubated at 37°C until colonies with morphology compatible with *M. bovis* appeared. DNA was then extracted from colonies (VAN SOOLINGEN et al., 1991) and subjected to PCR specific to *M. bovis* using two different previously published protocols (WARREN et al., 2006; MAYER et al., 2012), confirming their identification as *M. bovis*.

All samples analysed by histology (n = 29) displayed granulomatous lesions suggestive of tuberculosis, described as multifocal nodular areas of caseous necrosis, often mineralized, surrounded by inflammatory infiltrate of epithelioid macrophages, multinucleated giant cells, lymphocytes, plasmacytes and neutrophils associated with peripheral fibrosis. None of the samples were positive at Ziehl Neelsen stain. By molecular diagnosis, 44.4% (4/9) of samples tested positive for *M. bovis*. Following the bacterial isolation procedure, 55.5% (5/9) of samples presented colonies confirmed as *M. bovis* by PCR (Table 1). Only 2 samples gave positive results by both PCR and bacterial isolation.

Studies have identified *M. avium* Complex as the most important causative pathogens associated with swine granulomatous lesions; however, other authors have claimed the importance of *M. bovis* in regions that do not have bovine tuberculosis effectively under control (MUWONGE et al., 2012; BARANDIARAN et al., 2015).

In Brazil, bovine tuberculosis is endemic, and data implicating *M. bovis* or *M. avium* in swine granulomatous lesions are scarce and largely limited to regional studies (COLDEBELLA et al., 2018).

In the outbreak described here, all tested cases were associated with *M. bovis* and were probably contracted on the breeding farm, since all positive animals had the same origin. Animal infections can be traced to exposure to other infected animals (e.g., swine, cattle, or humans), contaminated food, or environmental sources (ÁLVAREZ et al., 2011; BARANDIARAN et al., 2015; JOHANSEN et al., 2014; MESSENGER; BARNES; GRAY, 2014). Exposure to contaminated food is considered most relevant to swine, given their feeding habits (BARANDIARAN et al., 2015). However, high density swine farming systems in Rio Grande do Sul are mostly operated by cooperative companies, which guarantee tight control of the breeding process (MIELE; WAQUIL, 2007), and are considered less likely to have infections related to contaminated food in their systems. Genotyping the isolates obtained here would provide hints about the probable source of infection and should be performed in future studies.

Given the zoonotic potential of aTB, when cases are confirmed, investigations into the probable source of infection, and institution or review of management measures such as cleaning, disinfection, and temporary cessation of farm operations for sanitation are recommended. Providing regular employee instruction and correctly disposing of carcasses are also recommended (BARCELLOS et al., 2008). In the present report, the weaner-producing farm was identified as the likely source of infection, the finishing farms were subjected to disinfection and a short break in operations, and the employees were instructed to seek health care. Although it was not possible to define the source of infection, biosafety measures such as preventing animals from having contact with infected animals (including infected humans), avoiding feeding them with milk and dairy products, and avoiding possible sources of environmental contamination could prevent the occurrence of future outbreaks.

Three different techniques were used for aTB diagnosis to characterize this aTB outbreak in domestic swine. Although all harvested samples had histological lesions compatible with aTB, not all samples were positive by bacterial isolation or PCR. Such discrepancies may occur due to factors such as number of viable microorganisms, and level of lesion calcification. We thus recommend using more

than one test to confirm the disease, which should provide higher diagnostic accuracy, as has been suggested in previous reports (MEDEIROS et al., 2010; LOPES et al., 2020).

Although less frequent, pigs may be responsible for zoonotic tuberculosis, rendering continuous monitoring of this species critical. Thus, certified swine breeding farms are tested at six-month intervals by random sampling using comparative tuberculin test (MAPA, 2002). Additionally, there is no direct contact between swine and other animal species. However, despite these efforts, this study shows an outbreak of tuberculosis in animals from the same piglet production unit, indicating that greater oversight is needed at extensive pig breeding units to prevent swine aTB outbreaks.

Acknowledgements

The authors are thankful for Ândrea Sara Dutra for the English language revision. BCL is recipient of CAPES scholarship (grant no 88887.337504/2019-00) and DD is a CNPq 1A fellow (grant no 310489/2020-2). The Project was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Finance code 001.”

Ethics Statement

The manuscript does not contain clinical studies or patient data. Moreover, no animals were manipulated in the study, being the samples collected during a routine slaughter and diagnosis made in laboratory routine. The data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

Declaration of Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

Authors' Contributions

All authors contributed to the report conception. The slaughterhouse inspection and detection of the lesions was made by Daniel Holanda Soares. The histological analysis was performed by Fernando Froner Argenta, Lauren Santos de Mello, Saulo Petinatti Pavarini and David Driemeier. The molecular analysis and bacterial isolation were performed by Bruna Correa Lopes, Marina Roth Vidaletti and Fabiana Quoos Mayer. The first draft of the manuscript was written by Bruna Correa Lopes under supervision of Fabiana Quoos Mayer and David Driemeier. All authors read and approved the final manuscript.

References

- ABPA. **Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (2019)**. SÃO PAULO, SP: [s. n.], 2019. Available from: <<http://abpa-br.org/relatorios/>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- ÁLVAREZ, J. et al. Epidemiological investigation of a *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* outbreak in swine. **Epidemiology and Infection**, [s.l.], v.139, n.1, p.143–148, 2011. Available from: <<https://doi.org/10.1017/S0950268810001779>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- BARANDIARAN, S. et al. Tuberculosis in swine co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium bovis* in a cluster from Argentina. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v.143, n.5, p.966–974, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.1017/S095026881400332X>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- BARCELLOS, D. E. S. N. de et al. Advances in biossecurity programs in pig production. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s.l.], v.36, n. Supl 1, p.33–46, 2008. Available from: <<http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/4753/material/Biosseguridade3.pdf>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- BRASIL. **Decreto N° 9.013 de 29 de Março de 2017**, Diário Oficial da União Diário Oficial da União, Brasília, Brasília: 2017. p. 1–76. Available from: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- BYRNE, A. W. et al. Editorial: Bovine tuberculosis-international perspectives on epidemiology and management. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v.6, p.1–5, 2019. Available from: <<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00202>>. Accessed: Oct. 12, 2019.

- COLDEBELLA, A. et al. **Avaliação dos dados de abate e condenações/desvios de suínos registrados no Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal nos anos de 2012 a 2014.** Embrapa Suínos e Aves. CONCÓRDIA, SC: 2018. Available from: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1093942/1/final8762.pdf>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- COUSINS, D. V. Chapter 3.4.6. Bovine Tuberculosis. In: OIE TERRESTRIAL MANUAL 2018. 8th Edition [S. l.]: **World Organization for Animal Health**, 2018. p.1058–1074. E-book.
- JOHANSEN, T. B. et al. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in swine associated with peat used for bedding. **BioMed Research International**, [s.l.], v.2014, p.1–8, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1155/2014/189649>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- LOPES, B. C. et al. A molecular strategy to optimize bovine tuberculosis post-mortem diagnosis and the exposure to *Mycobacterium tuberculosis* variant bovis. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], 2020. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05718-7>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- MAPA. **Instrução Normativa No 19, de 15 de Fevereiro de 2002.** Diário Oficial da União publicado em 1º de Março de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002. Available from: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/15143003-in-19-2002-normas-grsc.pdf>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- MAYER, F. Q. et al. *Mycobacterium bovis* infection in a collared peccary (*Tayassu tajacu*): Insights on tuberculosis wild reservoirs. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v.160, n.3–4, p.549–551, 2012. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.033>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- MEDEIROS, L. dos S. et al. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v.41, n.3, p.531–541, 2010. Available from: <<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010005000002>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- MESSENGER, A. M.; BARNES, A. N.; GRAY, G. C. Reverse zoonotic disease transmission (Zooanthroponosis): A systematic review of seldom-documented

- human biological threats to animals. **PLoS ONE**, [s. l.], v.9, n.2, p.1–9, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089055>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- MIELE, M.; WAQUIL, P. D. Cadeia Produtiva da Carne Suína no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, [s.l.], v.16, n.1, p.75–87, 2007. Available from: <<https://doi.org/10.1088/1742-5468/2004/12/P12002>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- MUWONGE, A. et al. *Mycobacterium bovis* infections in slaughter pigs in Mubende district, Uganda: a public health concern. **BMC Veterinary Research**, v.8, p.168, 2012. Available from: <<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-168>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- STROMEROVA, N. H.; FALDYNA, M. *Mycobacterium avium* complex infection in pigs: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s.l.], v.57, n. June, p.62–68, 2018. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.06.005>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- VAN SOOLINGEN, D. et al. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v.29, n.11, p.2578–2586, 1991. Available from: <<https://doi.org/10.1128/jcm.29.11.2578-2586.1991>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- WARREN, N. C. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v.10, n.7, p.818-822, 2006. Available from: <<https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2006/00000010/00000007/art00019;jsessionid=3wejlir3aeej0.x-ic-live-01>>. Accessed: Oct. 12, 2019.
- WHO. The control of neglected zoonotic diseases : community based interventions for NZDs prevention and control: report of the third conference organized with ICONZ, DFID-RiU, SOS, EU, TDR and FAO with the participation of ILRI and OIE. **World Health Organization. The Control of Neglected Zoonotic Diseases**, [s. l.], n.3, p.1–83, 2010. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44746/1/9789241502528_eng.pdf>. Accessed: Oct. 12, 2019.

Table 1 - Analyzed samples and results. All samples were negative at Ziehl Neelsen at histology analysis.

Animal	Tissue	Histology (HE)	Tissue PCR	Bacterial Isolation
1	Head lymph nodes	+	+	+
2	Gastrohepatic lymph nodes	+	np	np
	Spleen	+	np	np
3	Pulmonary lymph nodes	+	-	+
4	Neck lymph nodes	+	np	np
5	Mesenteric lymph nodes	+	np	np
6	Gastrohepatic lymph nodes	+	np	np
7	Pulmonary lymph nodes	+	+	-
8	Liver	+	np	np
9	Liver	+	np	np
10	Gastrohepatic lymph nodes	+	np	np
	Pulmonary lymph nodes		np	np
11	Head lymph nodes	+	+	-
12	Lymph nodes	+	+	+
13	Liver	+	np	np
	Spleen	+	np	np
14	Liver	+	np	np
	Mesenteric lymph nodes	+	np	np
15	Gastrohepatic lymph nodes	+	np	np
16	Mesenteric lymph nodes	+	np	np
17	Lungs	+	np	np
	Neck lymph nodes	+	np	np
18	Mesenteric lymph nodes	+	-	+
19	Head lymph nodes	+	np	np
20	Liver	+	-	-
	Spleen	+	np	np
21	Lungs	+	-	-
	Pulmonary lymph nodes	+	np	np
22	Liver	+	np	np

Gastrohepatic lymph nodes	+	-	+
---------------------------	---	---	---

HE: Haematoxylin and Eosin; “+”: positive results; “-”: negative results; “np”: not performed.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tuberculose animal é uma doença de caráter zoonótico de importância negligenciada (ROMHA *et al.*, 2018). Os dados obtidos neste estudo a partir do relato de um surto de tuberculose em suínos domésticos permitem observar a ocorrência da doença em um sistema de criação intensivo com constante monitoramento sanitário. Ainda, Barandiaran *et al.* (2015) sugerem que a ocorrência de tuberculose animal é subestimada em países com situação endêmica, como é o caso do Brasil. Assim, é necessária maior testagem e implementação de melhores testes diagnósticos para detecção de animais infectados, visto a possível subestimação na detecção de casos positivos. Atualmente, a maior parte das lesões granulomatosas em suínos domésticos detectadas durante o abate é classificada como linfadenite causada por bactérias do complexo *M. avium*. Porém, não é possível a diferenciação das lesões causadas por *M. bovis* e pelo Complexo *M. avium* (MAC) através da avaliação macroscópica das lesões (NEUMANN; RAMIREZ; SCHWARTZ, 2010).

Adicionalmente, a monitoria sanitária realizada nos sistemas de produção intensivos de suínos se dá por meio da testagem semestral de granjas de reprodutores suídeos certificadas (GRSC) com tuberculina bovina e aviária (MAPA, 2002) em animais selecionados aleatoriamente após cálculo amostral. Embora a detecção de animais reagentes por este método seja uma importante ferramenta diagnóstica e de monitoramento, a acurácia do teste pode ser variável e, em algumas espécies, possuir baixos valores de sensibilidade e especificidade (COUSINS; FLORISSON, 2005). Desta forma, os dados apresentados no presente estudo levantam a questão sobre a frequência de lesões causadas por *M. tuberculosis* detectadas em abate de suínos que podem estar sendo classificadas como linfadenite. Estudos com amostragem em maior escala de lesões granulomatosas em matadouros para a confirmação diagnóstica através de um método alternativo à avaliação macroscópica, como PCR e isolamento bacteriano, devem ser realizados para melhor dimensionar o impacto da tuberculose na cadeia produtiva suinícola.

Ainda, sobre os suídeos asselvajados, não é estabelecido o real papel epidemiológico dentro da cadeia de transmissão da tuberculose animal que ocorre no Brasil. Sabe-se que os javalis são suscetíveis à infecção e que a doença ocorre em territórios no sul do país, como demonstrado no presente estudo e em estudos prévios (MACIEL *et al.*, 2018), mas para o estabelecimento do papel epidemiológico de um

determinado hospedeiro em uma doença é necessário conhecer algumas informações, tais quais: hospedeiros suscetíveis em um determinado ambiente; taxa de transmissão da bactéria; densidade e comportamento das espécies estudadas (NUGENT, 2011). Assim, estudos de epidemiologia molecular acessando o genoma de micobactérias isoladas de diferentes espécies são necessários para conhecer o impacto dos javalis na manutenção da tuberculose.

Além dos suídeos asselvajados, outras espécies silvestres podem albergar *M. bovis*, como o cateto (*Tayassu tajacu*) (MAYER *et al.*, 2012). Apesar de não ser o tema central da dissertação, é importante ressaltar a possibilidade de outras espécies da fauna silvestre atuarem como elos na cadeia de transmissão da tuberculose como ocorre em outras regiões do mundo (NUGENT, 2015). O manejo de animais silvestres é um tema delicado, pois muitas espécies podem estar em situação de risco de extinção. Por outro lado, também é necessário saber a situação epidemiológica de uma determinada doença – como a tuberculose animal – como forma de prevenção a extinção de espécies possivelmente ameaçadas.

Finalmente, é importante salientar que a tuberculose animal é uma doença que pode afetar muitas espécies e possui distribuição mundial, além de representar risco para a saúde humana, principalmente para pessoas com maior contato com animais silvestres e de produção (MENG; LINDSAY; SRIRANGANATHAN, 2009). Por ser uma espécie exótica invasora que causa prejuízos econômicos relacionados aos sistemas agropecuários e danos ambientais, o controle dos javalis é autorizado no Brasil pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). Desta forma, atualmente há aproximadamente 45.000 controladores de fauna autorizados a realizar abates de javalis, sendo a transmissão de doenças como a tuberculose um risco ocupacional para estas pessoas. Além dos controladores, veterinários e pessoas que trabalham no manejo de animais de produção também estão mais expostas ao risco de contrair doenças zoonóticas. Ainda, há uma crescente preocupação com a associação da tuberculose com doenças imunossupressoras (BRUCHFELD; CORREIA-NEVES; KALLENIUS, 2015), condição que torna o indivíduo mais suscetível a infecções. Assim, os dados do presente estudo chamam a atenção para a preocupação zoonótica da tuberculose em suídeos.

Concluindo, foi possível observar a ocorrência de um surto de tuberculose em suínos de terminação criados em um sistema intensivo, sendo importante salientar a

preocupação quanto ao monitoramento constante e técnicas mais eficazes de diagnóstico *in vivo* e *post-mortem* da tuberculose nesses animais com eventual contato com humanos e outros animais de produção ou de vida livre. Além disso, a avaliação da associação entre a ocorrência de metastrongiloidíase e tuberculose em suídeos asselvajados permitiu concluir, a partir da população amostrada, que a presença de coinfeção não está ligada ao desenvolvimento de lesões granulomatosas compatíveis com tuberculose nesses animais. Desta forma, são necessários maiores esforços para avaliar outros aspectos da tuberculose animal em suídeos, de forma a entender a patogenia e manifestação da doença nesses animais, bem como para definir a atual situação epidemiológica da tuberculose no Brasil.

8. CONCLUSÕES

- Observou-se a ocorrência de um surto de tuberculose em suínos de terminação criados em um sistema intensivo no Rio Grande do Sul.
- É importante salientar a preocupação quanto ao monitoramento constante da tuberculose em suínos domésticos para evitar a possível subestimação da incidência da doença.
- Os suídeos asselvajados são suscetíveis a infecção por *M. bovis*, mas seu real papel na transmissão da tuberculose animal no Brasil não está estabelecido.
- A presença de coinfeção não está ligada ao desenvolvimento de lesões macroscópicas granulomatosas compatíveis com tuberculose nos suídeos asselvajados.
- A tuberculose continua sendo uma doença de caráter zoonótico e uma doença negligenciada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. **Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (2019)**.
SÃO PAULO, SP: [s. n.], 2019. Disponível em: <http://abpa-br.org/relatorios/>.
- ABSA. **American Biological Safety Association: Risk Group Classification for Infectious Agents**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://my.absa.org/Riskgroups>.
- ALIZON, Samuel. Co-infection and super-infection models in evolutionary epidemiology. **Interface Focus**, [s. l.], v. 3, n. 6, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0031>
- ANTHONY, Robert M. *et al.* Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 975–987, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri2199>
- BARANDIARAN, S *et al.* *Mycobacterium bovis* in Swine: Spoligotyping of isolates from Argentina. **Veterinary Medicine International**, [s. l.], v. 2011, p. 1–6, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4061/2011/979647>
- BARANDIARAN, S. *et al.* Tuberculosis in swine co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium bovis* in a cluster from Argentina. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 143, n. 5, p. 966–974, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S095026881400332X>
- BARRIOS-GARCIA, M. Noelia; BALLARI, Sebastian A. Impact of wild boar (*Sus scrofa*) in its introduced and native range: A review. **Biological Invasions**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 2283–2300, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0229-6>
- BEHAR, Samuel M.; DIVANGAHI, Maziar; REMOLD, Heinz G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: Is death an exit strategy?. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.: s. n.], v. 8, n. 9, p. 668–674, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2387>
- BLOMGRAN, Robert; ERNST, Joel D. Lung Neutrophils Facilitate Activation of Naive Antigen-Specific CD4 + T Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 186, n. 12, p. 7110–7119, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100001>
- BOWMAN, Dwight D. Helminths. *In: Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 10th. ed. [S. l.]: Elsevier Saunders, 2014. p. 122–240.
- BRASIL. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras**

- Micobactérias.** [S. l.: s. n.], 2008.
- BRUCHFELD, Judith; CORREIA-NEVES, Margarida; KALLENIOUS, Gunilla. Tuberculosis and HIV coinfection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 1–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017871>
- BUENO, C. Guillermo *et al.* Does wild boar rooting affect livestock grazing areas in alpine grasslands? **European Journal of Wildlife Research**, [s. l.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10344-010-0372-2>
- BYRNE, Andrew W. *et al.* Liver fluke (*Fasciola hepatica*) co-infection with bovine tuberculosis (bTB) in cattle: A retrospective animal-level assessment of bTB risk in dairy and beef cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 785–796, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.13083>
- CARTER, G.R.; WISE, Darla J. II Bacteria. *In: Essentials of Veterinary Bacteriology and Micology*. Sixth ed. Ames: [s. n.], 2004. p. 207–214.
- CLARIDGE, Jen *et al.* *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. **Nature Communications**, [s. l.], v. 3, n. May, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms1840>
- COELHO, Catarina *et al.* Unraveling *Sarcocystis miescheriana* and *Sarcocystis suis hominis* infections in wild boar. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 212, n. 3–4, p. 100–104, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.015>
- COLDEBELLA, Arlei *et al.* **Avaliação dos dados de abate e condenações/desvios de suínos registrados no Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal nos anos de 2012 a 2014**. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves, 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1093942/1/final8762.pdf>.
- 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**, [s. l.], v. 112, n. 2-4 SPEC. ISS., p. 303–312, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.015>
- COUSINS, D.V. Chapter 3.4.6. Bovine Tuberculosis. *In: OIE Terrestrial Manual 2018*. 8th Edition. [S. l.]: World Organization for Animal Health, 2018. p. 1058–1074. *E-book*.

- COUSINS, D. V.; FLORISSON, N. **A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species.** [*s. l.*: *s. n.*], 2005. Disponible em: <https://doi.org/10.20506/rst.24.3.1635>
- DE GARINE-WICHATITSKY, M. *et al.* A review of bovine tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in sub-Saharan Africa. **Epidemiology and Infection**, [*s. l.*], v. 141, n. 7, p. 1342–1356, 2013. Disponible em: <https://doi.org/10.1017/S0950268813000708>
- DIEL, Roland *et al.* Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- γ release assay for developing active tuberculosis: An update. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [*s. l.*], v. 183, n. 1, p. 88–95, 2011. Disponible em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0974OC>
- DOMINGO, M.; VIDAL, E.; MARCO, A. Pathology of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, [*s. l.*], v. 97, n. S, p. S20–S29, 2014. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>
- EDUARDO, L.; BERMUDEZ, M.; YOUNG, L. S. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates human macrophages to inhibit growth or kill *Mycobacterium avium* complex. **Journal of Leukocyte Biology**, [*s. l.*], v. 48, n. 1, p. 67–73, 1990. Disponible em: <https://doi.org/10.1002/jlb.48.1.67>
- EZENWA, Vanessa O.; JOLLES, Anna E. From host immunity to pathogen invasion: The effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. **Integrative and Comparative Biology**, [*s. l.*], v. 51, n. 4, p. 540–551, 2011. Disponible em: <https://doi.org/10.1093/icb/icr058>
- FLYNN, Jo Anne L. *et al.* An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Experimental Medicine**, [*s. l.*], v. 178, n. 6, p. 2249–2254, 1993. Disponible em: <https://doi.org/10.1084/jem.178.6.2249>
- FLYNN, Jo Anne L. *et al.* Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, [*s. l.*], v. 2, n. 6, p. 561–572, 1995. Disponible em: [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90001-2](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90001-2)
- GARCÍA-GONZÁLEZ, Ángela María *et al.* Epidemiologic study of lung parasites

- (*Metastrongylus* spp.) in wild boar (*Sus scrofa*) in southwestern Spain. **Journal of Wildlife Diseases**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 157–162, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.7589/2011-07-217>
- GASSÓ, Diana *et al.* An identification key for the five most common species of *Metastrongylus*. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 9, p. 3495–3500, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4001-y>
- GELDMACHER, Christof; ZUMLA, Alimuddin; HOELSCHER, Michael. Interaction between HIV and *Mycobacterium tuberculosis*: HIV-1-induced CD4 T-cell depletion and the development of active tuberculosis. [S. l.: s. n.], **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 7, n. 3, p. 268-75, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e3283524e32>
- GHAVIDEL, Mahdis *et al.* The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing: A systematic review. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 118, p. 310–315, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.036>
- GORTÁZAR, Christian *et al.* The status of tuberculosis in European wild mammals. **Mammal Review**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 193–206, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00191.x>
- GRAVES, H. B. Behavior and Ecology of Wild and Feral Swine (*Sus Scrofa*). **Journal of Animal Science**, [s. l.], 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas1984.582482x>
- JAKSIC, Fabian M. *et al.* Invaders without frontiers: Cross-border invasions of exotic mammals. **Biological Invasions**, [s. l.], v. 4, n. 1–2, p. 157–173, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1020576709964>
- JENSEN, Paul A. *et al.* **Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Settings**. [S. l.], 2005. Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5417a1.htm?s_cid=rr5417a1_e. Acesso em: 9 out. 2020.
- KUMAR, S. Nalin *et al.* Granuloma with langhans giant cells: An overview. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, [s. l.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0973-029X.125211>
- LAGE, AP *et al.* **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da**

- tuberculose animal (PNCEBT).** [S. l.]: Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.
- LAWN, Stephen D.; BUTERA, Salvatore T.; SHINNICK, Thomas M. *Tuberculosis unleashed: The impact of human immunodeficiency virus infection on the host granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis*.* **Microbes and Infection**, [s. l.], 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01582-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01582-4)
- LÁZÁR-MOLNÁR, Eszter *et al.* Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 30, p. 13402–13407, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1007394107>
- LEE, James J.; LEE, N. A. Eosinophil degranulation: An evolutionary vestige or a universally destructive effector function?. **Clinical & Experimental Allergy** [S. l.: s. n.], v. 35, n. 8, p. 986-94, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02302.x>
- LOPES, Bruna Correa *et al.* A molecular strategy to optimize bovine tuberculosis post-mortem diagnosis and the exposure to *Mycobacterium tuberculosis* variant bovis. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05718-7>
- MACIEL, A. L.G. *et al.* Tuberculosis in Southern Brazilian wild boars (*Sus scrofa*): First epidemiological findings. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 518–526, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.12734>
- MAPA. **Instrução Normativa No 19, de 15 de Fevereiro de 2002. Diário Oficial da União publicado em 1º de Março de 2002. Diário Oficial da União, Brasília**, Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/15143003-in-19-2002-normas-grsc.pdf>
- MARKEY, Bryan *et al.* Section 2: Bacteriology. *In: Clinical Veterinary Microbiology*. Second Edied. [S. l.]: Mosby Elsevier, 2013. p. 105–456.
- MAXIE, Grant. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals: Sixth Edition**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2012-0-00823-X>

- MAYER, Fabiana Quoos *et al.* *Mycobacterium bovis* infection in a collared peccary (*Tayassu tajacu*): Insights on tuberculosis wild reservoirs. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 160, n. 3–4, p. 549–551, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.033>
- MCDONALD, Robbie A. Animal health: How to control bovine tuberculosis. **Nature** [S. l.: s. n.], v. 511, p. 158-159, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature13514>
- MENG, X. J.; LINDSAY, D. S.; SRIRANGANATHAN, N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 364, n. 1530, p. 2697–2707, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0086>
- MIN, Booki *et al.* Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20040590>
- MOREAU, Emmanuelle; CHAUVIN, Alain. Immunity against helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 2010, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2010/428593>
- MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U. Directions and issues in bovine tuberculosis epidemiology and control in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 256–265, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00480169.1995.35904>
- NANDI, Bisweswar; BEHAR, Samuel M. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 208, n. 11, p. 2251–2262, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20110919>
- NEUMANN, E J; RAMIREZ, A; SCHWARTZ, K J. **Swine Disease Manual**. 10th Edited. [S. l.]: American Association of Swine Veterinarians, 2009. *E-book*.
- NUGENT, Graham. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: A New Zealand case study. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 151, n. 1–2, p. 34–42, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.023>
- NUGENT, Graham. Toward eradication : The effect of *Mycobacterium bovis*

- infection in wildlife on Toward eradication : the effect of *Mycobacterium bovis* infection in wildlife on the evolution and future direction of bovine tuberculosis management in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal** [s. l.], n. 63, v. 1 (sup1), p. 4-18, 2015. Disponível em:
<https://doi.org/10.1080/00480169.2014.971082>
- NUNES-ALVES, Cláudio *et al.* In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Reviews Microbiology** [S. l.: s. n.], v. 12, n. 4, p. 289-299, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3230>
- OLIVEIRA, S.J. Bactérias Gram-positivas de interesse em veterinária. *In: Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária*. Canoas: Editora ULBRA, 2012. p. 55–66.
- PATHAK, Ashutosh K. *et al.* Immuno-epidemiology of chronic bacterial and helminth co-infections: Observations from the field and evidence from the laboratory. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 647–655, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.04.011>
- PAWLOWSKI, Andrzej *et al.* Tuberculosis and HIV co-infection. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2012. Disponível em:
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002464>
- PEDROSA, Jorge *et al.* Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 577–583, 2000. Disponível em:
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.577-583.2000>
- POLLOCK, John M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **Veterinary Journal** [S. l.: s. n.], v. 163, n. 2, p. 115-27, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0655>
- RALPH, Anna R.; LUCAS, Robyn M.; NORVAL, Mary. Vitamin D and solar ultraviolet radiation in the risk and treatment of tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 77–88, 2013. Disponível em:
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70275-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70275-X)
- RIBEIRO-RODRIGUES, R. *et al.* A role for CD4+ CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 144, n. 1, p. 25–34, 2006. Disponível em:
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03027.x>

- RIOJAS, Marco A. *et al.* Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 324–332, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002507>
- RISCO, David *et al.* Nasal shedding of *Mycobacterium tuberculosis* in wild boar is related to generalised tuberculosis and concomitant infections. **Veterinary Record**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/vr.105511>
- RISCO, David *et al.* Severity of bovine tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in wild boar. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110123>
- ROMHA, Gebremedhin *et al.* Epidemiology of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in animals: Transmission dynamics and control challenges of zoonotic TB in Ethiopia. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 158, n. September 2017, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.06.012>
- ROOK, G.A.W.; HERNANDE-PANDO, Rogelio. The pathogenesis of tuberculosis. **Annual review of microbiology**, [s. l.], v. 50, p. 259–284, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)33832-9](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)33832-9)
- SALGAME, Padmini; YAP, George S.; GAUSE, William C. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 1118–1126, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.2736>
- SAUNDERS, Bernadette M. *et al.* Transmembrane TNF Is Sufficient to Initiate Cell Migration and Granuloma Formation and Provide Acute, but Not Long-Term, Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 174, n. 8, p. 4852–4859, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4852>
- SCHWARZ, P *et al.* Tuberculosis outbreak in a pig farm due to *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 197–200, 2002.

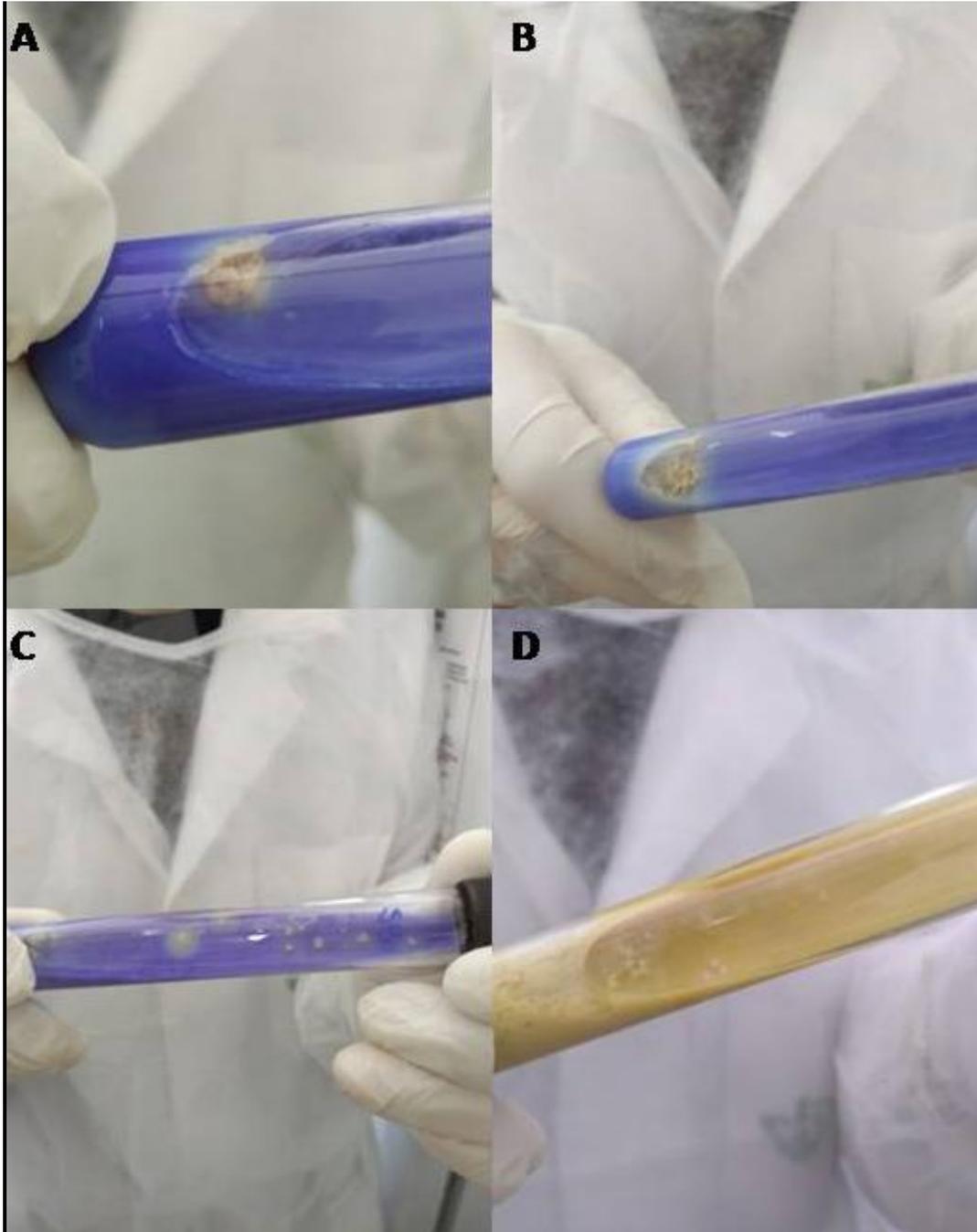
- SILAGHI, Cornelia; PFISTER, Kurt; OVERZIER, Evelyn. Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Germany. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 371–373, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1495>
- STADECKER, Miguel J. *et al.* The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, [s. l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00197.x>
- STROMEROVA, Nikola Hulinova; FALDYNA, Martin. *Mycobacterium avium* complex infection in pigs: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 57, n. June, p. 62–68, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.06.005>
- THOEN, Charles O; STEELE, James H; GILSDORF, Michael J. ***Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans**. Second Edied. Ames: [s. n.], 2006.
- TORTORA, G J; FUNKE, B R; CASE, C L. Chapter 16: Innate Immunity: Nonspecific Defenses of the Host. *In: Microbiology: An Introduction*. 13th Edited. [S. l.]: Pearson, 2018a. *E-book*.
- TORTORA, G J; FUNKE, B R; CASE, C L. Chapter 17: Adaptive Immunity: Specific Defenses of the Host. *In: Microbiology: An Introduction*. [S. l.]: Pearson Benjamin Cummings, 2018b. *E-book*.
- TURNER, J. *et al.* CD8- and CD95/95L-dependent mechanisms of resistance in mice with chronic pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 203–209, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.2.4370>
- VILCHÈZE, Catherine; KIM, John; JACOBS, William R. Vitamin C potentiates the killing of *Mycobacterium tuberculosis* by the first-line tuberculosis drugs isoniazid and rifampin in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 1–6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.02165-17>
- WHO. **Global Tuberculosis Report 2019**. Geneva: [s. n.], 2019. Disponível em: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
- WOODWORTH, Joshua S.; WU, Ying; BEHAR, Samuel M. *Mycobacterium tuberculosis* -Specific CD8 + T Cells Require Perforin to Kill Target Cells and Provide Protection In Vivo . **The Journal of Immunology**, [s. l.], 2008.

Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8595>

YOUNG, Jamie S.; GORMLEY, Eamonn; WELLINGTON, Elizabeth M.H.

Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1946-1952.2005>

APÊNDICE A – Isolados de *M. bovis*.

Colônias de *M. bovis* em meios a base de ovos: Stonebrink (“A”, “B” e “C”) e Lowenstein Jensen (D). Fonte: arquivo pessoal (2021).