

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
METODOLOGIA APLICADA À CONCLUSÃO DE CURSO**

**INFECÇÃO POR *Mycobacterium* sp. EM HERBÍVOROS SELVAGENS:
ESTUDO RETROSPECTIVO DE 12 CASOS (2003-2012) COM DETECÇÃO
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Elaborado por Vanessa Lanes Ribeiro
Acadêmica em Medicina Veterinária

**Porto Alegre
2013/1**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
METODOLOGIA APLICADA À CONCLUSÃO DE CURSO

Infecção por *Mycobacterium* sp. em herbívoros selvagens: estudo retrospectivo de 12 casos (2003-2012) com detecção imuno-histoquímica

Autora: Vanessa Lanes Ribeiro

Matrícula: 00170800

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Veterinária da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para
obtenção do grau de Médica
Veterinária**

Orientador: David Driemeier

Co-orientador: Elisandro Oliveira
dos Santos

Porto Alegre

2013/1

RESUMO

A tuberculose é uma enfermidade infectocontagiosa, granulomatosa, debilitante, causada por bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) pertencentes a diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). As micobacterioses têm importância em Medicina Veterinária devido ao seu potencial zoonótico e sua distribuição mundial, afetando todas as classes de vertebrados. Em animais selvagens, as micobacterioses têm sido um problema relatado principalmente em cativeiro. Também há relatos de sua ocorrência em animais de vida livre, colocando em risco e dificultando os programas de erradicação da tuberculose em animais de produção. O diagnóstico em geral é *post mortem*, uma vez que o teste de tuberculina não está padronizado para as espécies selvagens, assim como não é confiável para triagem. Na necropsia identificam-se as lesões, além da observação microscópica de BAAR na coloração de ZN e principalmente, no isolamento e identificação do agente. Porém, apenas a morfologia macro e microscópica não permite distinguir a espécie de *Mycobacterium* envolvida. A IHQ realizada com anticorpo policlonal anti-*M. tuberculosis* confirma infecção pelo CMT, mas não é específica, pois há marcação cruzada com outras micobactérias. O objetivo deste trabalho foi descrever, através de um estudo retrospectivo, as características histológicas, bem como os achados na coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) e na técnica de imuno-histoquímica (IHQ) dos casos de herbívoros selvagens diagnosticados com tuberculose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS) no período de 2003 a 2012, registrando-se 12 casos da doença no período. A partir dos blocos de parafina foram confeccionadas novas lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina e coloração de ZN. As amostras foram submetidas à técnica de IHQ pelo método estreptavidina-biotina ligada a peroxidase para *M. tuberculosis*. Todos os animais eram adultos e pertenciam às seguintes espécies: cervo sambar (4/12), lhama (5/12), cervo vermelho (1/12), anta brasileira (1/12) e antílope Nilgai (1/12), provenientes de cativeiro. Na IHQ observou-se marcação acentuada (3/12), moderada (4/12) ou discreta (4/12), exceto em um caso em que não havia quantidade suficiente de material. As características histológicas, bem como os achados na coloração de ZN e na técnica de IHQ dos casos de herbívoros selvagens diagnosticados com tuberculose no SPV-UFRGS de 2003 a 2012 levaram ao diagnóstico de infecção por *Mycobacterium* sp., sendo métodos rápidos e eficientes, que podem ajudar na prevenção da

disseminação da doença em animais do mesmo plantel a curto prazo. Em dois casos, houve isolamento de *M. bovis*, após três meses em cultivo, sendo a técnica padrão ouro para identificação do agente, porém tem como desvantagem a demora na obtenção dos resultados.

Palavras-chave: camelídeos, cervídeos, histopatologia, *Mycobacterium*, tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis is a debilitating granulomatous infectious disease, caused by acid-fast bacillus (AFB) that belongs to different species of Mycobacterium tuberculosis complex (MTC). Mycobacteriosis are important in veterinary medicine because of its zoonotic potential and worldwide distribution, affecting all classes of vertebrates. In wild animals, mycobacteriosis have been reported mainly as a problem in captivity. There are also reports in free-ranging wildlife, endangering and hampering tuberculosis eradication programs in animal production. The diagnosis is usually post mortem, because the tuberculin test is not standardized for wildlife species, and also it is not reliable for screening. At post-mortem exam, lesions were identified at necropsy, microscopic observation of AFB was made on ZN staining of tissues and mainly isolation and identification of the agent were performed. However, only gross and microscopic exams doesn't distinguish Mycobacterium species involved on the lesion. IHC performed with polyclonal anti-M. CMT confirms tuberculosis infection, but is not specific, with other mycobacteria. The aim of this study was to describe, through a retrospective study, the histological features of the lesion, as well as the findings in Ziehl-Neelsen (ZN) technique and immunohistochemistry (IHC) of cases of wildlife herbivores diagnosed with tuberculosis in Setor de Patologia Veterinária UFRGS (SPV-UFRGS) during the period of 2003 to 2012. 12 cases were recorded in the period. Formalin fixed paraffin embedded tissues were recut and, stained with hematoxylin and eosin and ZN staining. The samples were submitted to IHC technique, method streptavidin-biotin peroxidase bound to M. tuberculosis. All animals were adults, living in captivity and belonged to the following species: sambar deer (4/12), llama (5/12), red deer (1/12), Brazilian tapir (1/12) and antelope Nilgai (1/12). In IHC, it was observed accentuated intensity of immunostaining (3/12), moderate (4/12) and discrete (4/12), except in a case where there was insufficient material. Histological features, as well as findings in ZN staining and IHC technique in wild life herbivores cases diagnosed with tuberculosis in SPV-UFRGS 2003-2012 led to the diagnosis of infection with Mycobacterium sp., turning into fast and efficient methods of diagnosis, which can help to prevent the spread of this disease in animals from the same herd in short term period. In two cases, M. bovis was isolated after three months in culture, which is the

gold standard technique for the identification of the agent, but has the disadvantage of lateness in obtaining results.

Keywords: *camelids, deer, histopathology, Mycobacterium, tuberculosis.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Alterações macroscópicas da tuberculose em herbívoros selvagens.....	14
Figura 2 - Achados histológicos das lesões de tuberculose em herbívoros selvagens.....	16
Figura 3 - Coloração de Ziehl-Neelsen e técnica de imuno-histoquímica para tuberculose em herbívoros selvagens.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS

TB: Tuberculose

HE: Hematoxilina e eosina

ZN: Ziehl-Neelsen

IHQ: Imuno-histoquímica

PCR: Reação em cadeia da polimerase

CMT: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

M. bovis: *Mycobacterium bovis*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3	RESULTADOS.....	13
3.1	Caracterização dos casos.....	13
3.2	Caracterização histológica.....	15
3.3	Caracterização imuno-histoquímica.....	16
4	DISCUSSÃO.....	18
5	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* compreende bactérias com morfologia de cocobacilos pleomórficos, sendo todas aeróbicas estritas, imóveis, não filamentosas, nem segmentadas, desprovidas de esporos ou cápsulas. São parasitos intracelulares obrigatórios e apresentam a particularidade da alta concentração lipídica na parede celular, o que lhes confere a característica especial de álcool-ácido resistência, isto é, a retenção de corantes após a descoloração com solução álcool-ácido. Também por esse motivo não são permeáveis aos corantes empregados na coloração de Gram, embora apresentem parede celular compatível com bactéria Gram-positiva. Estes lipídeos também estão envolvidos com propriedades de resistência aos mecanismos de defesa humorais dos hospedeiros, aos desinfetantes ácidos e alcalis, à dessecação e à resistência a antimicrobianos (BALIAN, 1995; COETZER; TUSTIN 2004; CASWELL; WILLIAMS, 2007).

A tuberculose (TB) é uma enfermidade infectocontagiosa, granulomatosa, crônica e debilitante (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006). Tuberculose é a denominação comum da doença que pode ser causada por diferentes espécies de bactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (MILLER, 2008; LÉCU; BALL, 2011). O CMT inclui as espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*, sendo *M. tuberculosis* a causa predominante de TB em humanos e elefantes; e *M. bovis* em mamíferos domésticos e selvagens (MILLER, 2008; CORNER; MURPHY; GORMLEY, 2011).

A doença tem importância em Medicina Veterinária devido ao potencial zoonótico, ao caráter insidioso e à distribuição mundial (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006). A maioria das micobactérias do CMT tem a capacidade de infectar animais selvagens, enquanto a suscetibilidade, a patogenia e a resposta imune em relação à infecção variam amplamente entre as micobactérias e a espécie do hospedeiro animal. Embora algumas espécies de mamíferos mostrem uma menor taxa de incidência (por exemplo, equídeos e primatas neotropicais), o resultado da infecção ainda é difícil de prever e, portanto, a erradicação da TB está potencialmente ligada à capacidade de diagnóstico precoce nos hospedeiros domésticos e selvagens (LÉCU; BALL, 2011).

Há diversos relatos de ocorrência da doença predominantemente em animais selvagens mantidos em cativeiro (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; MILLER, 2008). Em cervídeos, por

exemplo, a infecção por *Mycobacterium* sp. tem sido um problema em fazendas comerciais e em animais de zoológico. Outro problema está relacionado à ocorrência da doença na fauna silvestre de vida livre que interage com animais domésticos. Em países desenvolvidos, várias espécies silvestres são naturalmente infectadas por *M. bovis*, consideradas, então, importantes fontes de infecção para bovinos, fato que dificulta ainda mais os programas de erradicação da tuberculose bovina (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; RADOSTITS *et al.*, 2007; MILLER, 2008). Num estudo realizado por García-Jiménez *et al.*, em 2012, foi encontrada uma prevalência de 23,21% (26/112) de lesões macroscópicas durante a necropsia compatíveis com TB bovina em cervo-dama (*Dama dama*). Os animais eram de vida-livre e o estudo foi realizado numa propriedade próxima a Madrid, com animais abatidos durante o período de caça em outubro e novembro de 2010 (GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 2012). Apesar disso, a doença é considerada muito rara em indivíduos de áreas pouco expostas às ações antrópicas ou ao contato direto com humanos (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006).

O potencial zoonótico destes organismos apresenta uma preocupação adicional para tratadores de animais e para o público em visitação em parques e zoológicos. Portanto, o diagnóstico rápido e preciso é necessário em espécies selvagens (MILLER, 2008). O diagnóstico de tuberculose em animais selvagens se baseia nas provas de tuberculinização, que não estão devidamente padronizadas. Dessa forma, o diagnóstico muitas vezes é *post mortem*, podendo auxiliar na prevenção da doença em indivíduos do mesmo plantel. É baseado na identificação das lesões e observação microscópica de bactérias álcool-ácido resistentes (BAAR) na coloração de Ziehl-Neelsen (ZN). Contudo, apenas a morfologia macro e microscópica não permite distinguir a espécie de *Mycobacterium* sp. envolvida. Por esse motivo, o diagnóstico definido como padrão ouro é o isolamento e a identificação do agente micobacteriano envolvido, apesar do cultivo exigir métodos, procedimentos e meios especiais, além do período prolongado para obtenção de resultados, exigindo de 2 semanas até 3 meses para as micobactérias pertencentes ao grupo de crescimento lento, o que inclui, todas as micobactérias do CMT (WITMER *et al.*, 2003; CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; MILLER, 2008; LÉCU; BALL, 2011).

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) pode ser muito eficaz na identificação de bactérias do gênero *Mycobacterium* spp. nos tecidos dos animais afetados. Este método é particularmente útil quando não há material disponível para isolamento bacteriano. Além disso,

os resultados são muito rápidos, contrastando marcadamente com o longo período necessário de crescimento das micobactérias.

O objetivo deste trabalho foi descrever as características histológicas, bem como os achados na coloração histoquímica de ZN e na técnica de IHQ nos casos de herbívoros selvagens diagnosticados com tuberculose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS) no período de 2003 a 2012.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os arquivos de exames anatomopatológicos do período de janeiro de 2003 a agosto de 2012 do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) foram revisados e levantados os casos de infecção por *Mycobacterium* sp. em herbívoros selvagens. Dados referentes ao histórico e lesões macroscópicas foram registrados, agrupados e analisados. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo a 3µm de espessura e confeccionadas novas lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina (HE) e foi realizada coloração de ZN para avaliação microscópica. Realizou-se o estudo morfológico das lesões de tuberculose em diversos órgãos, principalmente pulmão.

As amostras foram submetidas à técnica de IHQ pelo método estreptavidina-biotina ligada a peroxidase para *M. tuberculosis*. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi obtido com a incubação dos cortes dos tecidos em solução a 10% de peróxido de hidrogênio (30 vol.) em metanol durante 15 minutos. Para a recuperação antigênica utilizou-se protease XIV (sigma) por 15 minutos, em temperatura ambiente. Para bloqueio da reação inespecífica foi utilizado leite desnatado 5% por 15 minutos. O anticorpo primário *Mycobacterium tuberculosis* (GeneTex, Inc. Clone GTX 20905) foi diluído a 1:200 em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 45 minutos a 37°C. Após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation) por 20 minutos cada etapa. O cromógeno utilizado para a revelação foi o 3,3'-diaminobenzidina (DAB, K3468, DakoCytomation) e foi utilizada hematoxilina de Harris na contracoloração, seguida da montagem em meio Entellan. Como controle positivo utilizou-se um corte histológico de tecido pulmonar de bovino com tuberculose. Para as diferentes intensidades de marcação foram atribuídos os graus de ausência de marcação e intensidades discreta, moderada e acentuada.

Para o exame bacteriológico, as amostras de linfonodo e de pulmão de duas lhamas (*Lama glama*) foram homogeneizadas, descontaminadas com cloreto de 1-hexadecilpiridínio (HPC) em 1,5%, inoculadas nos meios de Stonebrink e de Lowenstein-Jensen, e incubou-se a 37° C.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização dos casos

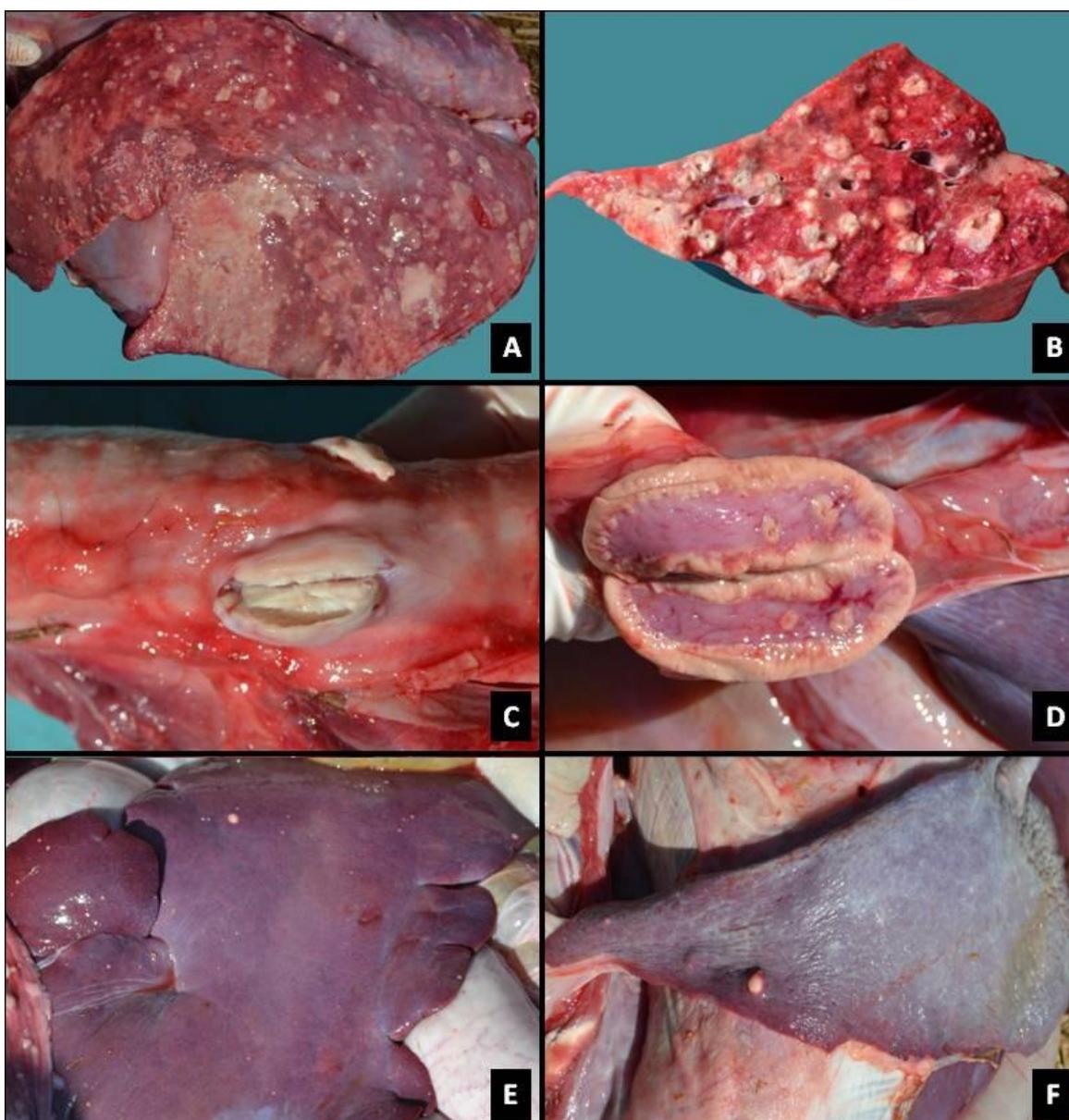
No período de 2003 a 2012 foram realizados 12 diagnósticos de infecção por *Mycobacterium* sp. em herbívoros selvagens. Todos os animais eram adultos e pertenciam às seguintes espécies: lhama (*Lama glama*) (5/12), cervo sambar (*Cervus unicolor*) (4/12), cervo vermelho (*Cervus elaphus*) (1/12), anta brasileira (*Tapirus terrestris*) (1/12) e antílope Nilgai (*Boselaphus tragocamelus*) (1/12), provenientes de dois parques zoológicos do estado do Rio Grande do Sul. Quanto ao sexo, 6/12 eram machos e 6/12 eram fêmeas.

A maioria dos indivíduos (11/12) viviam num parque safári, eram alimentados com ração comercial para equinos, cana-de-açúcar moída e forragem verde como cameron, aveia, milho, milho e azevém. No local viviam cerca de 500 cervídeos (cervo sambar, cervo vermelho e cervo dama) e camelídeos (lhama e camelo), além de capivaras, macacos-prego, zebras, hipopótamos, avestruzes, cisnes, entre outros, em três recintos coletivos. Dentre as manifestações clínicas observaram-se prostração (6/10), emagrecimento progressivo (5/10), anorexia (3/10), dispneia (4/10), abscessos múltiplos na região de mandíbula e pescoço (2/10), aborto (1/10) e três animais tiveram morte súbita. Dois animais (2/12) não possuíam histórico.

Na necropsia foi observada condição corporal regular a ruim, cavidade torácica com grande quantidade de líquido turvo e filamentos de fibrina, aderência entre pleuras parietal e visceral e nódulos esbranquiçados caseosos de 0,5 a 1 cm de diâmetro (3/12); pulmões difusamente consolidados com múltiplos nódulos de 0,5 a 5 cm de diâmetro, caseosos, esbranquiçados, distribuídos por todo o parênquima pulmonar (12/12) com ranger da faca ao corte; fígado aumentado de volume, com evidenciação do padrão lobular (7/12) e nódulos de 0,1 a 0,5cm de diâmetro, branco-amarelados, aspecto caseoso e distribuição aleatória, alguns desses nódulos eram firmes (3/12); linfonodos aumentados (6/12), principalmente os mesentéricos, cervicais superficiais, traqueobrônquicos e mediastínicos, que estavam esbranquiçados e com aspecto caseoso ao corte (4/12); intestino delgado com áreas hemorrágicas na mucosa (3/12); rins congestos (2/12), pálidos (1/12) ou com nódulos de 0,1 a 0,5cm de diâmetro, branco-amarelados e firmes (1/12); baço aumentado (4/12) ou com nódulos de 0,1 a 0,5cm de diâmetro, branco-amarelados e firmes no parênquima (1/12); pâncreas com nódulos esbranquiçados (1/12); saco

pericárdico com espessamento acentuado com deposição de fibrina na superfície externa e múltiplos nódulos de até 0,5 cm de diâmetro, esbranquiçados e caseosos; coração vermelho-escuro (1/12), com atrofia serosa da gordura epicárdica e placas brancacentas elevadas e irregulares na parede do átrio direito e áreas esbranquiçadas de 0,1cm no miocárdio (1/12); quantidade moderada de exemplares de *Haemonchus* sp. no abomaso (2/12); e no ceco havia pequena quantidade de exemplares de *Trichuris* sp. (1/12) (**Figuras 1-A, B, C, D, E, F**).

Figura 1 - Alterações macroscópicas da tuberculose em herbívoros selvagens.



Fonte: o próprio autor

Lhama (*Lama glama*) **A.** Pulmão com consolidação e múltiplos nódulos caseosos de 0,5 a 5 cm de diâmetro distribuídos por todos os lobos, mais numerosos nos lobos caudais. **B.** Pulmão (superfície de corte), com múltiplos nódulos caseosos. **C.** Linfonodos traqueobrônquicos difusamente esbranquiçados e caseosos. **D.** Rim com nódulos de 0,1 a 0,5cm de diâmetro à superfície de corte, branco-amarelados. **E.** Fígado com discreto aumento de volume, vermelho-escuro e nódulos de distribuição aleatória de 0,1 a 0,5cm de diâmetro, branco-amarelados. **F.** Baço apresentando nódulos de 0,1 a 0,5cm de diâmetro, branco-amarelados.

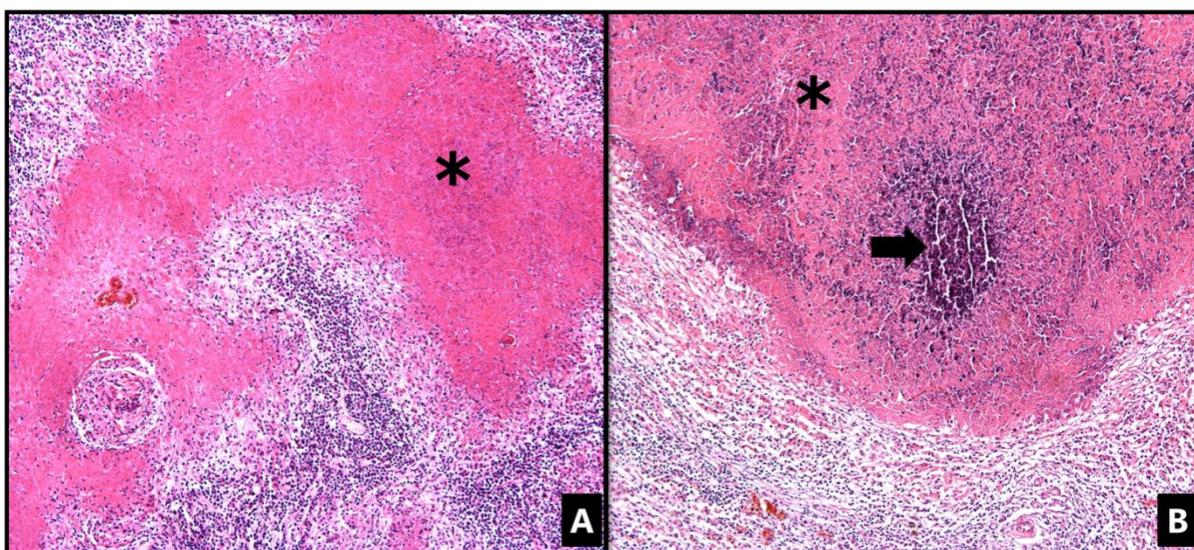
3.2 Caracterização histológica

No exame histológico dos pulmões de todos os casos observaram-se extensas áreas de necrose caseosa com mineralização discreta a moderada, circundadas por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos, cercados por tecido conjuntivo fibroso (12/12) (**Figura 2-A e B**). Em alguns casos havia também edema moderado a abundante acentuado, rico em proteína (5/12), células gigantes e fibrina (7/12) preenchendo a luz alveolar. Nos linfonodos evidenciou-se necrose caseosa com mineralização moderada circundada por macrófagos, células gigantes (1/12) e linfócitos (1/12) e discreto a abundante tecido conjuntivo colagenizado (5/12); nos testículos havia extensas áreas de necrose caseosa com mineralização moderada, circundadas por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos, cercados por tecido colagenizado (1/12); no encéfalo foram evidenciadas áreas de necrose multifocal moderada em meninges, circundadas por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos (1/12); intestino delgado com necrose caseosa circundada por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos, com discreta proliferação de tecido fibrovascular nas placas de Peyer (1/12); rins com focos de necrose caseosa e glomerulonefrite membranoproliferativa discreta, com macrófagos, células gigantes e linfócitos (2/12); baço com granuloma focalmente extenso, áreas de necrose caseosa com mineralização moderada cercada por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e proliferação de tecido conjuntivo fibroso (1/12); fígado com focos de necrose caseosa, cercados por macrófagos, células epitelioides, e linfócitos, com discreta proliferação fibrovascular periférica e congestão centrolobular com proliferação de tecido conjuntivo (3/12); no saco pericárdico havia necrose caseosa multifocal a coalescente cercada por infiltrado acentuado de macrófagos epitelioides e linfócitos, ocasionais neutrófilos e proliferação acentuada de tecido conjuntivo. Havia grande quantidade de fibrina e ocasionais neutrófilos, linfócitos e macrófagos associados à proliferação fibrovascular adjacente (1/12).

Na coloração de ZN foram evidenciados BAAR em quantidade grande (5/12), moderada (1/12) ou escassa (4/12) em áreas de necrose e no citoplasma de macrófagos e de células gigantes multinucleadas no parênquima pulmonar e, em um caso, no linfonodo mandibular (**Figura 3-A**). Em dois casos não foi possível verificar a presença de BAAR.

De dois casos de lhama (*Lama glama*) foram realizados cultura bacteriológica e isolamento de *Mycobacterium bovis* após 90 dias de cultivo.

Figura 2 - Achados histológicos das lesões de tuberculose em herbívoros selvagens.



Fonte: o próprio autor

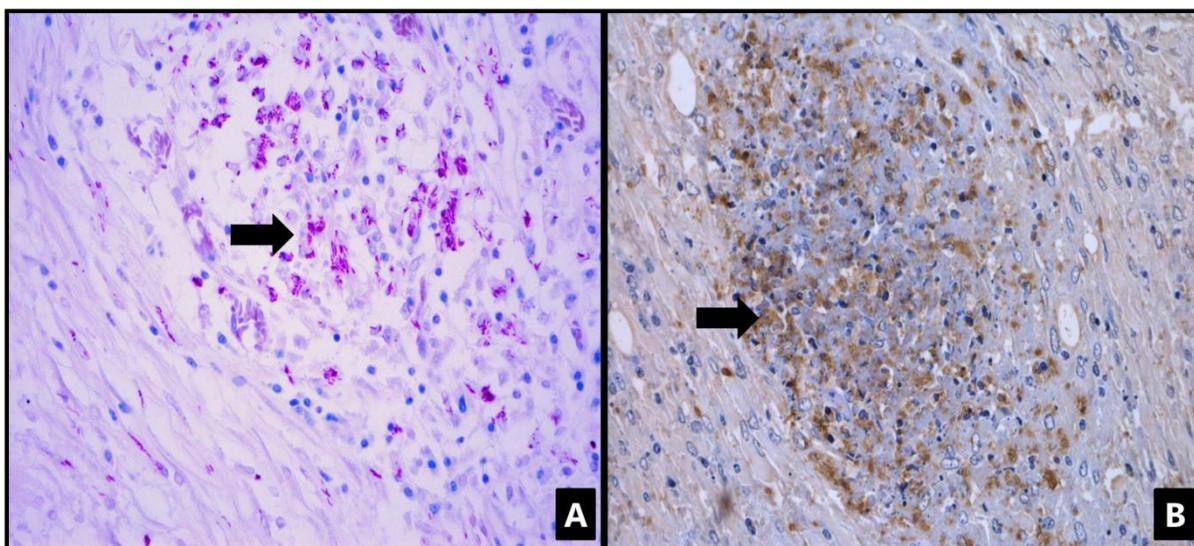
A. Anta (*Tapirus terrestris*): linfonodo com extensa área de necrose caseosa (asterisco). HE, obj.10. **B.** Lhama: pulmão com área de necrose caseosa (asterisco) e mineralização moderada (seta). HE, obj.10.

3.3 Caracterização Imuno-histoquímica

Na técnica de IHQ foi empregado o anticorpo *Mycobacterium tuberculosis* para a detecção de bactérias do gênero *Mycobacterium* sp. Observou-se marcação acentuada (3/12), moderada (4/12) ou discreta (4/12) em áreas de necrose, livre ou no citoplasma de macrófagos necróticos, em macrófagos epitelioides e em células gigantes viáveis no parênquima pulmonar (**Figura 3-B**). Em um dos casos também houve marcação discreta em células gigantes multinucleadas na meninge e, em outro, foi evidenciada marcação discreta nas áreas de necrose, livre ou no citoplasma de macrófagos necróticos, em macrófagos epitelioides e células gigantes

viáveis em linfonodo mandibular. Em um caso não foi possível realizar IHQ devido à quantidade insuficiente de material.

Figura 3 - Coloração de Ziehl-Neelsen e técnica de imuno-histoquímica para tuberculose em herbívoros selvagens.



Fonte: o próprio autor

Pulmão de Lhama (*L. glama*) **A.** Evidenciação de bactérias álcool-ácido-resistentes em grande quantidade em área de necrose (seta). Ziehl-Neelsen, obj.40. **B.** Marcação imuno-histoquímica anti-*Mycobacterium tuberculosis* em área de necrose caseosa (seta). Estreptavidina-biotina ligada à peroxidase, obj. 40.

4 DISCUSSÃO

O diagnóstico clínico da tuberculose tem validade limitada, devido à característica insidiosa da enfermidade e aos sinais clínicos inespecíficos (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006). Diferentes técnicas de diagnóstico por imagem podem auxiliar no diagnóstico da TB, mas são apenas informativos sobre a localização e o aspecto das lesões. O exame radiográfico pode ser limitado, dadas as características das espécies animais de zoológicos: as dimensões torácicas de alguns animais podem inviabilizar a utilização de imagens radiográficas (por exemplo, ungulados com mais de 250 kg), as imagens de lesões podem estar ausentes e elas podem ser muito pequenas para detecção radiográfica. Além disso, em algumas espécies, lesões mineralizadas são raras (por exemplo, em felinos e primatas não-humanos) (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; LÉCU; BALL, 2011). Ultrassonografia de alta frequência, tomografia computadorizada e ressonância magnética também poderiam ser úteis para detecção de lesões em linfonodos não-palpáveis, quando eles estão no tórax ou porque a conformação dos animais impede a palpação. Porém, o tamanho dos pacientes, a limitação de abordagem clínica e imobilização física ou química, disponibilidade dos dispositivos e custo podem impedir a sua utilização em espécies de zoológico (LÉCU; BALL, 2011). Nos animais analisados não havia histórico de realização de técnicas de diagnóstico por imagem.

Nenhum teste *ante mortem* tem total confiabilidade para diagnóstico de TB em animais de zoológico. A abordagem para exames de rotina e exame clínico de casos suspeitos exige a aplicação de várias modalidades de exames. É importante ressaltar que a maioria dos testes não é validada para espécies silvestres e exóticas; e os exames com base em resposta imunológica em especial, podem mostrar variação significativa entre espécies (MILLER, 2008).

Portanto, o diagnóstico *in vivo* da tuberculose em animais selvagens ainda é um desafio, baseando-se na realização de provas imunológicas intradérmicas de hipersensibilidade tardia (tuberculinização) a extratos proteicos purificados (PPD, *purified protein derivative*) de micobactérias, a tuberculina. Esse método foi padronizado primeiramente para humanos e posteriormente para bovinos domésticos. Dessa forma, o emprego dessa técnica em animais selvagens é sujeito a grande quantidade de variáveis, que conferem ao procedimento baixos graus de sensibilidade e especificidade para diversos *taxa*. Derivados proteicos purificados preparados

a partir de *M. bovis* (tuberculina mamífera) e *M. avium* (tuberculina aviária) são comumente empregados (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006).

Os animais acometidos eram cervídeos (5/12), lhamas (5/12), além de anta (1/12) e antílope (1/12), todos provenientes de cativeiro. Em relação às espécies selvagens acometidas, há diversos relatos de ocorrência da doença predominantemente em animais mantidos em cativeiro. Há relatos de TB em primatas, bovídeos, cervídeos e outros artiodáctilos (antílopes, girafas, camelídeos sul-americanos e do velho mundo, entre outros), elefantes asiáticos, perissodáctilos (antas, equídeos, rinocerontes), carnívoros, pinípedes, marsupiais, psitacídeos e outras aves (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; MILLER, 2008, LÉCU; BALL, 2011). O papel potencial da fauna silvestre na manutenção e na propagação da infecção por *M. bovis* em animais domésticos tem sido amplamente divulgado em vários países. São citados “cuzu” (*Trichosurus vulpecula*), uma espécie de marsupial da Nova Zelândia (PORPHYRE; STEVENSON; McKENZIE, 2008), “texugo europeu” (*Meles meles*) na Irlanda e Reino Unido (DELAHAY; CHEESEMAN; CLIFTON-HADLEY, 2001; CORNER, 2006; CORNER; MURPHY; GORMLEY, 2011; CORNER *et al.*, 2012), javali (*Sus scrofa*) na Espanha (NARANJO *et al.*, 2008) e diferentes espécies de cervídeos, como o cervo-vermelho (*Cervus elaphus*) na Nova Zelândia e na Grã-Bretanha (DELAHAY; CHEESEMAN; CLIFTON-HADLEY, 2001); e o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) em Michigan, EUA (O’BRIEN *et al.*, 2001). Infecção por *Mycobacterium bovis* também foi relatada em cervo-dama (*Dama dama*) em vida livre (RHYAN; SAARI, 1995; JOHNSON *et al.*, 2008).

No Brasil foi realizado um estudo usando reação em cadeia da polimerase (PCR) para averiguar a ocorrência de tuberculose por *M. bovis* em cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) no estado do Mato Grosso do Sul, com resultado negativo em todos os casos, apesar da TB ser endêmica no rebanho bovino brasileiro. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, embora os cervos e o gado bovino vivam na mesma área, não haja contato estreito entre essas espécies (LUNA *et al.*, 2003).

A tuberculose é uma doença importante em cervídeos em cativeiro e em animais de vida livre em todo mundo. *Mycobacterium bovis* tem sido detectado em uma grande variedade de espécies, incluindo wapiti (*Cervus canadensis*), veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), cervo-sika (*Cervus nippon*), caribou (*Rangifer tarandus*), cervo-orelhudo (*Odocoileus hemionus*), cervo-dama (*Dama dama*) e alce (*Alces alces*), embora *M. tuberculosis* e *M. avium* também

tenham sido isolados (MILLER, 2008). Devido ao potencial zoonótico e aos impactos da enfermidade sobre a agropecuária, existe um programa federal nos Estados Unidos, o qual regula a movimentação dos animais entre estados, sendo exigido o teste de tuberculinização. Alguns estados adotam medidas mais rigorosas relativas ao movimento intra-estadual. O teste diagnóstico primário é o teste cervical simples usado em rebanhos de cervídeos de cativeiro em animais com mais de um ano. O teste de tuberculinização dupla comparativa é utilizado como contraprova em animais suspeitos no primeiro teste. Os exames histopatológico, de cultura e isolamento do agente e PCR são complementares. Os resultados são submetidos a órgãos oficiais estaduais e federais de sanidade animal. Devido à especificidade e sensibilidade variável desses testes e a dificuldade em distinguir infecções por *M. bovis* daquelas causadas por *M. avium* e outras micobactérias, testes alternativos também são realizados em casos suspeitos, como teste de estimulação de linfócitos, ensaio imunoenzimático (ELISA, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), immunoblot (*Western Blotting – Immunoblotting*), “rapid test” (*Lateral-Flow Immunochromatography*) e “MAPIA” (*Multiantigen Print Immunoassay*). Os animais que apresentem sinais clínicos são submetidos a exame clínico e complementares como hemograma, testes bioquímicos, radiografias torácicas, teste cervical simples, lavagem traqueobrônquica para pesquisa de BAAR e cultura, PCR, se possível aspirado de linfonodo ou biópsia para exame histológico e cultura e imunoenaios. A necropsia com colheita de todos os órgãos, principalmente linfonodos deve ser realizada em todos os animais que morrem ou são eutanasiados (MILLER, 2008). Em um estudo realizado por Palmer *et al.* (2007), foi realizada vacinação de veados-de-cauda-branca (*O. virginianus*) com bacilo Calmette Guérin (BCG), e observou-se proteção mensurável em testes sorológicos contra *M. bovis*. Porém, foi ressaltada a necessidade de investigação mais aprofundada sobre o assunto, inclusive a possibilidade de que a bactéria injetada a partir da vacina seja eliminada e contamine outros indivíduos não vacinados (PALMER; THACKER; WATERS, 2007).

A tuberculose também tem sido encontrada em camelídeos sul-americanos e do velho mundo. Os mesmos testes de rotina utilizados em cervídeos também tem sido usados para camelídeos e são realizados regularmente, podendo ser exigidos para transporte interestadual e internacional dos animais (MILLER, 2008).

A infecção pulmonar por *M. Bovis* e *M. tuberculosis* tem sido relatada em antas em cativeiro. Também foi descrito o isolamento de *M. avium*. (MANGINI, 2006). Há recomendação

do monitoramento através do teste de tuberculinização simples, porém, semelhante aos camelídeos, as antas também podem mostrar reação inespecífica ao teste, gerando interpretação confusa. Por esse motivo, outro método diagnóstico utilizado é a cultura e identificação do agente e PCR a partir de lavado traqueobrônquico (MILLER, 2008).

Neste estudo foram observados vários sinais clínicos, especialmente emagrecimento progressivo, anorexia, prostração, dispneia, abscessos em região de mandíbula e pescoço, mas três animais tiveram morte sem sinais clínicos e um animal abortou, provavelmente devido à hipertermia causada pela infecção. Os sinais clínicos da TB são raramente vistos antes da morte nos animais de zoológico, sendo que muitos animais infectados apresentam doença subclínica até que a doença esteja avançada. Esta é uma característica comportamental importante em animais selvagens, que sem mantêm em cativeiro, mascarando os sinais clínicos para evitar a predação em vida livre. Contudo, alguns sinais clínicos podem estar presentes e devem estar na lista de diagnóstico diferencial para qualquer mamífero que apresente perda de peso crônica, fraqueza, dispneia, tosse e aumento de volume em linfonodos. Tosse e dispneia indicam estágio final e irreversível da forma pulmonar da doença. O sinal clínico mais frequentemente notado entre os mamíferos é perda de peso crônica (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; MILLER, 2008; LÉCU; BALL, 2011). Portanto, a quarentena deve ser realizada como rotina em animais introduzidos em coleções zoológicas nas espécies sensíveis (MILLER, 2008).

A infecção pelo *Mycobacterium* spp. ocorre predominantemente por via oral ou respiratória, mas outras vias de infecção podem ocorrer, como a transplacentária e a percutânea. Animais infectados podem eliminar o agente pelas secreções do trato respiratório, saliva, fezes, urina e por meio de fístulas submandibulares (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; RADOSTITS *et al.*, 2007).

Devido aos fatores supracitados de dificuldade de diagnóstico clínico, o diagnóstico muitas vezes é *post mortem*, que pode auxiliar na prevenção da doença em indivíduos do mesmo plantel. O diagnóstico citológico e/ou histológico é baseado na observação microscópica das micobactérias. Quando o número de bacilos é muito pequeno, o local preferencial de pesquisa histopatológica é ao redor do centro caseoso, nas células epitelioides e de Langhans. Apenas a morfologia, tanto macro quanto microscópica da tuberculose, não permite distinguir qual a espécie de *Mycobacterium* sp. envolvida, uma vez que as lesões induzidas pelas diversas espécies de micobactérias são semelhantes entre si.

No presente estudo, o exame histopatológico dos pulmões de todos os casos observaram-se extensas áreas de necrose caseosa com mineralização discreta a moderada, cercadas por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos, circundados por tecido conjuntivo fibroso. Em um estudo realizado por Rhyan e Saari em 1995, foram comparadas características das lesões de tuberculose na histopatologia de bovinos, cervo-dama (*Dama dama*), cervo-sika (*Cervus nippon*), cervo-vermelho (*Cervus elaphus elaphus*) e a subespécie “rocky mountain” (*Cervus elaphus nelsoni*). As lesões foram marcadas por necrose caseosa, mineralização, neutrófilos, macrófagos, células gigantes e BAAR. Algumas diferenças na morfologia da lesão entre as espécies foram notadas. Nas lesões de “rocky mountain” e cervo-vermelho havia marcada variação e, muitas vezes, as lesões diferiam daquelas encontradas nos bovinos; geralmente tinham mineralização periférica dispersa ao invés de mineralização central e continham mais neutrófilos e menor número de células gigantes que as lesões de bovinos. As lesões em cervo-dama continham mais células gigantes, mas foram indistinguíveis de lesões do “rocky mountain”. As lesões em cervo-sika tinham mais células gigantes e menos neutrófilos do que nas lesões de bovinos ou outras espécies de cervídeos. Células gigantes de cervo-sika eram maiores e continha mais núcleos do que células gigantes nas outras espécies.

Nesse mesmo estudo (RHYAN; SAARI, 1995), em bovinos, foram encontrados focos necróticos com mineralização central moderada e frequentemente rodeados por quantidade moderada de células epitelioides, linfócitos e células gigantes de Langhans. A maioria das lesões era parcial ou completamente circundada por tecido conjuntivo colageneizado com penetração capsular focal pelo processo granulomatoso e extensão da lesão no parênquima de órgãos adjacentes. Acúmulos focais de neutrófilos e leucócitos degenerados foram frequentemente dispersos ao redor do material necrótico caseoso, na sua interface com o manto de células inflamatórias. O material necrótico era geralmente intensamente eosinofílico e homogêneo, contendo detritos de cromatina escassa e poucos neutrófilos dispersos. Células gigantes de Langhans eram redondas ou ovais e rotineiramente contendo menos de 30 núcleos visíveis. Material mineralizado geralmente não se estendia até o manto de células inflamatórias. Em algumas lesões, os processos necrosantes granulomatosos eram altamente invasivos, com fibrose mínima e mineralização. Lesões de pulmão de bovino foram semelhantes às lesões de linfonodos. BAAR eram escassos até numerosos e estavam distribuídos aleatoriamente no material caseoso e manto de células inflamatórias.

No presente estudo, foram encontradas no encéfalo áreas de necrose multifocal moderada na meninge, circundada por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos em um indivíduo. Este não possuía descrição macroscópica de alteração no sistema nervoso central. A tuberculose no sistema nervoso central tem uma distribuição característica, com predominância de lesões em meninges da base do encéfalo denominada meningite basilar tuberculosa. A lesão pode se estender para a neurópila do encéfalo, causando encefalite. Histologicamente, as lesões de tuberculose no sistema nervoso central em bovinos consistem em granulomas multifocais com células gigantes de Langhans muitas vezes associadas à necrose caseosa e mineralização. As meninges estão macroscopicamente espessas e firmes (BARROS *et al.*, 2006).

Na coloração de ZN foram evidenciados BAAR em quantidade grande, moderada ou escassa em áreas de necrose e no citoplasma de macrófagos e de células gigantes multinucleadas no parênquima pulmonar e em um caso no linfonodo mandibular. A coloração das micobactérias fundamenta-se na característica de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), já que as células coradas com a fucsina não podem ser descoradas pelo álcool ou ácido, conferindo às bactérias coloração vermelha-viva em técnicas como a de Ziehl-Neelsen, a mais comumente empregada (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006). Porém, segundo Sakamoto (1997), o método de visualização de micobactérias pela coloração de Ziehl-Neelsen, a despeito de ser rápido e barato, só consegue revelar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes em concentrações superiores a 10^4 bactérias/mL. Esta técnica não permite distinguir os membros da Família *Mycobacteriaceae* e outros microorganismos, tais como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, que apresentam as mesmas características tintoriais (SAKAMOTO, 1997).

Em um estudo realizado por Fitzgerald *et al.* (2000), com comparação das técnicas de detecção de *M. bovis post mortem* em veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), o número de BAAR visto era extremamente variável de caso para caso, de escassos até grande quantidade. Além disso, a localização desses BAAR também foi variável, sendo mais frequentemente vistos no interior do citoplasma de células gigantes multinucleadas e menos frequentemente dentro do citoplasma de macrófagos livres ou necróticos (FITZGERALD *et al.*, 2000).

Em dois casos não houve evidenciação de BAAR na coloração de ZN, o que pode ter sido um falso-negativo por escassez de bactérias. As técnicas de coloração de ZN e cultura podem

apresentar baixa sensibilidade, como demonstrado em um estudo por Estrada-Chavez *et al.*, 2004, que comparou os métodos rotineiros de diagnóstico de TB bovina (histopatologia, coloração de ZN e cultura) com PCR e Nested-PCR, utilizando bovinos leiteiros. A baixa sensibilidade da cultura e da coloração de ZN foi justificada, entre outras causas, pela escassez de bactérias em lesões crônicas, com extensa fibrose, necrose e mineralização (ESTRADA-CHAVEZ *et al.*, 2004).

Em decorrência dos limites impostos pelos diversos métodos diagnósticos mencionados, é importante ressaltar que o diagnóstico definitivo da tuberculose é baseado no isolamento e identificação do agente micobacteriano envolvido. Tal isolamento pode ser feito tanto *ante* quanto *post mortem* e o material utilizado para o cultivo pode ser obtido por meio de lavados gástricos ou traqueais, ou a partir de lesões sugestivas durante a necropsia (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006; LÉCU; BALL, 2011). Além disso, em bovinos a cultura pode apresentar baixa sensibilidade pela escassa quantidade de bactérias em lesões crônicas, como já mencionado (ESTRADA-CHAVEZ *et al.*, 2004).

Mycobacterium bovis foi cultivado e isolado de material pulmonar colhido na necropsia de duas lhamas (*L. glama*). No isolamento primário, o *M. bovis* é aeróbio ou cresce em microaerofilia, a 37° C, requer meio e o crescimento é aumentado pela adição de piruvato (CORNER; MURPHY; GORMLEY, 2011). Estes dados corroboram com os autores, que descrevem como predominantemente isolado o agente *M. bovis* em cervídeos e outros artiodáctilos, como camelídeos sul-americanos (CATÃO-DIAS; CARVALHO, 2006, LÉCU; BALL, 2011). Os casos relatados de tuberculose em camelídeos sul-americanos (lhama, alpaca, vicunha e guanaco) em seu habitat natural são considerados raros, sendo que estas espécies são consideradas com alto nível de resistência à tuberculose (FOWLER, 2006). No entanto, há relatos de infecção em camelídeos sul-americanos em estreita associação com outros animais infectados, e que pastavam próximos a bovinos infectados e “texugo europeu” no Reino Unido. Também há relatos de infecção de camelídeos pelos agentes *M. microti* e *M. kansasii* (OEVERMANN *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2008).

A técnica de IHQ mostrou ser muito eficaz na identificação de bactérias do gênero *Mycobacterium* sp. nos tecidos dos animais afetados. Este método pode ser particularmente útil quando não há material disponível para isolamento bacteriano. Além disso, os resultados são muito rápidos quando comparados, contrastando marcadamente com o período necessário para o

crescimento das micobactérias. Embora a histopatologia convencional e a coloração de ZN sejam adequadas para identificar micobactérias, não possuem tanta sensibilidade e especificidade quanto a IHQ. A imunomarcação proporciona uma melhor precisão de diagnóstico, uma vez que utiliza anticorpos dirigidos contra antígenos. Também pode ser usada para identificar as micobactérias em lesões granulomatosas que foram negativas na histologia e na coloração de ZN (PAOLICHI *et al.*, 2001). A utilização da coloração de ZN mostrou distribuição semelhante à observada na IHQ. Porém, os anticorpos comerciais existentes não distinguem os diferentes tipos de micobactérias, com reações cruzadas entre elas (micobactérias tuberculosas, micobactérias não tuberculosas e bacilos da lepra) (ALVES; BACCHI; VASSALO, 1999). O tempo de fixação em formol é considerado um fator limitante na técnica de IHQ, pois a fixação prolongada em formalina pode resultar na redução de detecção do antígeno (WEBSTER *et al.*, 2009). Esta situação não foi evidenciada no presente estudo, visto que houve imunomarcação na maioria dos casos.

A probabilidade de transmissão zoonótica entre os animais de zoológico e humanos requer a combinação de vários eventos, relacionados ao estado imunológico, ao tempo de exposição a animais infectados, sendo maior em manipuladores diários desses animais do que em pessoas com contato breve, como público em visita (LÉCU; BALL, 2011). O diagnóstico de TB em uma coleção zoológica deve ser realizado, com restrição de trânsito animal quando necessário, levando em consideração também questões associadas com a saúde humana e a eutanásia de animais potencialmente saudáveis, uma vez que não recomenda-se o tratamento de animais doentes, devido a dificuldade de eliminação do agente e seu potencial zoonótico (MILLER, 2008).

5 CONCLUSÃO

As características histológicas, bem como os achados na coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) e na técnica de imuno-histoquímica (IHQ) dos casos de herbívoros selvagens diagnosticados com tuberculose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS) no período de 2003 a 2012 levaram ao diagnóstico de infecção por *Mycobacterium* sp., sendo métodos rápidos e eficientes, que podem ajudar na prevenção da disseminação da doença em animais do mesmo plantel a curto prazo. Os exames bacteriológicos permitiram identificar *M. bovis* como espécie de micobactéria que causou a doença em dois casos, após três meses em cultivo, é a técnica padrão ouro na identificação do agente, mas tem como desvantagem a demora na obtenção de resultados.

REFERÊNCIAS

- ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de imunohistoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
- BALIAN, S. C. **Estudo das linfadenites tuberculóides em suínos abatidos em matadouro da região da Grande São Paulo, no período de 1993 a 1994. Aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias**. 1995. 78 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- BARROS, C. S. L. *et al.* Tuberculose. *In:* _____. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Coleção Vallée, 2006. cap. 15, p. 81-86.
- CATÃO-DIAS, J. L.; CARVALHO, V. M. Tuberculose. *In:* CUBAS Z. S., SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS J. L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2006. v. 1, p. 726-735.
- CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. Respiratory system. *In:* MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals**. 5th ed. Edinburgh: Elsevier, 2007. v. 2, cap 5, p. 523-653.
- COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. Bacterial diseases. *In:* COUSINS, D.V. *et al.* **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed. Cape Town: Oxford, 2004. v. 3, section 5.
- 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**, Dublin, v. 112, n. 2-4, p. 303-312, 2006.
- CORNER, L. A. L.; MURPHY, D.; GORMLEY, E. *Mycobacterium bovis* Infection in the Eurasian Badger (*Meles meles*): the Disease, Pathogenesis, Epidemiology and Control. **Journal of Comparative Pathology**, Dublin, v. 144, n. 1, p. 1-24, Jan. 2011.
- CORNER *et al.* The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. **The Veterinary Journal**, Dublin, v. 194, n. 2, p. 166-172, Nov. 2012.
- DELAHAY, R. J.; CHEESEMAN, C. L.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in the European badger (*Meles meles*) and other British mammals. **Tuberculosis**, York, v. 81, n. 1-2, p. 43-49, 2001.
- ESTRADA-CHÁVEZ, C. *et al.* Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. **Veterinaria México**, Cidade do México, v. 35, n. 3, p. 225-236, 2004.
- FITZGERALD, S. D. *et al.* Comparison of postmortem techniques for the detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Michigan, v.12, n. 4, p. 322-327, July 2000.

FOWLER, M. E. Artiodactyla: *Camelidae* (Lhama, Alpaca, Guanaco, Vicunha). In: CUBAS Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS J. L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2006. v. 1, p. 630-640.

GARCÍA-JIMÉNEZ, W. L. *et al.* Histological and immunohistochemical characterisation of *Mycobacterium bovis* induced granulomas in naturally infected Fallow deer (*Dama dama*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Cáceres, v.149, n. 1-2, p. 66-75, Sep. 2012.

JOHNSON, L. K. *et al.* Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from British deer. **The Veterinary Journal**, Surrey, v. 175, n. 3, p. 409–412, Mar. 2008.

LÉCU, A.; BALL, R. Mycobacterial infections in zoo animals: relevance, diagnosis and management. **International Zoo Yearbook**, London, v. 45, n. 1, p. 183-202, Jan. 2011.

LUNA, J. O. *et al.* Tuberculosis survey of free-ranging marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 414–415, Dec. 2003.

MANGINI, P. R. *Perissodactyla- Tapiridae* (Anta), p.598-614. In: CUBAS Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2006. v. 1.

MILLER, M. Current diagnostic methods for tuberculosis in zoo animals. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine**. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2008. v. 6, cap. 2, p. 10-19.

NARANJO, V. *et al.* Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 1-2, p. 1–9, Feb.2008.

O'BRIEN, D. J. *et al.* Tuberculous lesions in free-ranging white-tailed deer in Michigan. **Journal of Wildlife Diseases**, Michigan, v. 37, n. 3, p. 608–613, Jul. 2001.

OEVERMANN *et al.* Generalized tuberculosis in llamas (*Lama glama*) due to *Mycobacterium microti*. **Journal of Clinical Microbiology**, Bern, v. 42, n. 4, p. 1818-1821, Apr. 2004.

PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; WATERS, W. R. Vaccination of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin. **Vaccine**, Ames, v. 25, n. 36, p. 6589–6597, June 2007.

PAOLICCHI, F. A. *et al.* Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*): an immunohistochemical study. **Journal of Veterinary Medicine**, Balcarce, v. 48, n. 4, p. 313-320, May 2001.

PORPHYRE, T.; STEVENSON, M. A.; MCKENZIE, J. Risk factors for bovine tuberculosis in New Zealand cattle farms and their relationship with possum control strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, Palmerston North, v. 86, n. 1-2, p. 93–106, Aug. 2008.

RADOSTITS, O. M. *et al.* (Ed.). Diseases associated with bacteria. *In*: _____. **Veterinary Medicine**: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10. ed. Saunders, 2007. cap. 19, p. 1007-1017.

RHYAN, J. C.; SAARI, D. A. A Comparative Study of the Histopathologic Features of Bovine Tuberculosis in Cattle, Fallow Deer (*Dama dama*), Sika Deer (*Cervus nippon*), and Red Deer and Elk (*Cervus elaphus*). **Veterinary Pathology Online**, Ames, v. 32, n. 3, p. 215-220, May 1995.

RYAN, E. G. *et al.* Tuberculosis in alpaca (*Lama pacos*) on a farm in Ireland: a clinical report. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 61, n. 8, p. 527-531, Aug. 2008.

SAKAMOTO, S. M. **Detecção e identificação de Mycobacterium bovis pela reação em cadeia polimerase (PCR)**. 1997. 43 f. Dissertação. (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

WEBSTER, J. D. *et al.* Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 57, n. 8, p. 763-761, Aug. 2009.

WITMER, G. *et al.* Mycobacterial diseases in wildlife. *In*: WILDLIFE DAMAGE MANAGEMENT CONFERENCE, 10, 2003, Fort Collins. **Proceedings....** Fort Collins: Wildlife Society, 2003. p. 309-315.