

IV Ciclo de Conferências

Conselho Técnico-Científico



Temas Atuais em Investigação



Edições
IPCB

Escola Superior Agrária
2018

Micobacterioses em Animais Selvagens

Aspetos Epidemiológicos e Histopatológicos

Ana Cristina Matos

Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Castelo Branco, Portugal
acmatos@ipcb.pt



Abstract

Mycobacterial species are raising serious concerns in livestock and wild animals worldwide. In wildlife, mycobacterial infection has been reported in hundreds of species and likely has the potential to occur in every vertebrate. Since this infection is of a chronic nature the best strategy to control the infection is through early identification of infected animals, and better diagnostic measures are required for effective control programs.

With the development of new molecular methods for detecting and characterizing microorganisms, the ecology of mycobacteria has rapidly advanced in all areas. In human medicine, polymerase chain reaction (PCR) assays are accepted diagnostic standards, replacing or complementing culture isolation and acid-fast staining.

The mycobacterial species that produce tuberculosis in humans and animals are included in the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). My-

cobacteria from the *Mycobacterium avium* complex (MAC) cause a variety of diseases including tuberculosis-like disease in humans and birds, disseminated infections in immunocompromised patients, lymphadenitis in humans and mammals and paratuberculosis in ruminants.

The aim of the present work was to gain a better understanding of the role of free-living mammalian species in the epidemiology of wildlife mycobacteriosis in Portugal.

Resumo

As micobacterioses causam sérias preocupações na produção animal e na vida selvagem, em todo o mundo. As infeções micobacterianas têm sido descritas em centenas de espécies de animais selvagens podendo afetar todos os animais vertebrados. Como estas infeções são de carácter crónico, a melhor estratégia de controlo passa pela identificação precoce dos animais infetados, melhorando a metodologia de diagnóstico e tornando efetivos os programas de controlo.

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular aplicadas à microbiologia, o conhecimento da ecologia das micobactérias avançou rapidamente em todas as áreas. Na medicina humana a reação em cadeia de polimerase (PCR) é aceite como técnica de diagnóstico, substituindo ou complementando o isolamento bacteriano e o esfregaço corado pelo método de Ziehl-Neelsen.

Atualmente, estão identificadas 172 espécies e 13 subespécies do género *Mycobacterium* (Euzéby, 2015). Das suas principais características destacam-se o elevado conteúdo de guadina – citosina no seu genoma e a composição única e complexa da sua parede celular que é constituída por ácidos gordos de cadeia longa, os ácidos micólicos, que fazem com que estes organismos sejam de crescimento lento e que sejam impermeáveis aos corantes hidrossolúveis – denominando-se Bacilos-Ácido-Álcool Resistentes (BAAR). São bacilos pleomórficos, retos ou ligeiramente curvos com 0,2-0,6 µm de diâmetro e 1,0-10 µm de comprimento, imóveis, não esporulados, sem cápsula, aeróbios e quimiorganotróficos, com temperaturas de crescimento ideais que variam entre 25-37°C.

A classificação das espécies deste género é feita de acordo com a sua velocidade de crescimento, atividade metabólica, morfologia da colónia, distribuição no ambiente e potencial patogénico.

As micobactérias de crescimento rápido formam colónias em meio só-

lido, num período inferior a 7 dias e são saprófitas em habitats naturais. As micobactérias de crescimento lento formam colônias num período superior a 7 dias e geralmente são patogênicas para o Homem e outros animais.

As micobactérias relevantes em medicina humana e medicina veterinária são agrupadas em complexos, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o complexo *Mycobacterium avium*, que incluem espécies que causam síndromes clínicas idênticas e apresentam uma elevada semelhança genética. As restantes micobactérias são referidas como atípicas ou não tuberculosas, mas duas destas são patogênicas responsáveis por duas patologias em humanos, a lepra e a úlcera de Buruli (Falkinham, 1996).

As espécies do género *Mycobacterium* responsáveis pela tuberculose nos humanos e outros animais são incluídas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC). Este complexo é constituído por 8 espécies de micobactérias de crescimento lento que causam tuberculose nos humanos e outros animais (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* e *M. mungi*) (Warren et al., 2006). Os membros deste complexo apresentam, a nível de sequência nucleotídica, uma semelhança superior a 99,9% com sequências de rRNA 16S idênticas, mostrando diferenças fenotípicas e de patogenicidade, estando adaptados a hospedeiros distintos, cada uma das espécies tem preferência por um hospedeiro distinto (Mostowy e Behr, 2005).

O principal agente etiológico da tuberculose em mamíferos selvagens e domésticos é a espécie *Mycobacterium bovis* (de Lisle et al., 2002). A tuberculose bovina é uma doença de distribuição mundial e com um impacto económico significativo e, por vezes, a dificuldade da sua erradicação está relacionada com a existência de reservatórios selvagens (Santos et al., 2009). *M. bovis* é muito semelhante a nível genético com *M. tuberculosis*, sendo o genoma do primeiro ligeiramente mais pequeno (Garnier et al., 2003).

As espécies do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) causam uma variedade de patologias, incluindo lesões típicas de tuberculose em humanos e aves, infeções disseminadas em pacientes imunodeprimidos, linfadenites em humanos e outros mamíferos e paratuberculose em ruminantes. O MAC é constituído por bactérias de crescimento lento e são ubiqüitárias no ambiente.

Originalmente, uma espécie, posteriormente dividida em 2 espécies: *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*. Mais tarde com os avanços da taxonomia molecular foram identificadas 7 novas espécies (Turenne et al., 2007).

Muitas subespécies de *M. avium* foram identificadas com base em crité-

rios bioquímicos (HPLC- ácidos micólicos) e moleculares (sequenciação do ITS ribossomal e RFLP de IS1245). Estas subespécies incluem *Mycobacterium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *hominissuis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*. Todas as subespécies *M. avium* e *M. intracellulare* são capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros e possuem um alto grau de semelhança genética (Thorel et al., 1990).

Apesar do seu agente etiológico ser conhecido há mais de um século, a tuberculose aviária continua a ser uma doença de difícil diagnóstico *ante mortem*. Ao exame *post mortem* o diagnóstico, por vezes, também se torna difícil devido aos achados de necrópsia não específicos e pela dificuldade na realização de cultura que, apesar de tudo, ainda constitui o método mais comum de diagnóstico de infecções micobacterianas. Ao longo dos últimos anos, a biologia molecular tem sido frequentemente aplicada na identificação e diferenciação destes microrganismos, constituindo uma ferramenta muito útil, pois possibilita a deteção de pequenas quantidades de DNA e de forma mais rápida que a cultura (Tell et al., 2003; Taddei et al., 2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico de enterite granulomatosa crónica de ruminantes, tendo sido já identificado por técnicas de microbiologia tradicional e por PCR em aves e mamíferos selvagens (Coelho et al., 2008a; Miranda et al., 2009; Matos et al., 2013).

O objetivo do presente trabalho foi compreender melhor o papel dos mamíferos selvagens na epidemiologia das micobacterioses zoonóticas e não zoonóticas na vida selvagem em Portugal, pretendendo fornecer uma visão mais aprofundada das micobacterioses em mamíferos selvagens.

Neste trabalho, foi estudada uma população de 2116 mamíferos selvagens e a prevalência de *Mycobacterium bovis* encontrada por espécie animal foi: 26.9% na raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), 20.0% no mangusto (*Herpestes ichneumon*), 21.4% no javali (*Sus scrofa*) e 38.3% no veado europeu (*Cervus elaphus*). Os resultados deste estudo confirmam a presença de *Mycobacterium bovis* em carnívoros selvagens em Portugal demonstrando-se, pela primeira vez, a infeção por *Mycobacterium bovis* em mangustos (*Herpestes ichneumon*), raposas (*Vulpes vulpes*), lontras (*Lutra lutra*), ginetas (*Genetta genetta*) e fuínhas (*Martes foina*). Também foi confirmada a infeção disseminada por *Mycobacterium bovis* em raposas vermelhas em Portugal, demonstrando-se pela primeira vez a ocorrência de infeção natural no cérebro destes animais.

A alta prevalência de tuberculose bovina, na área de estudo, em javalis (21.4%) e veados (38.3%) coincide com a elevada prevalência de tuberculose bovina em bovinos domésticos na região.

Com o objetivo de determinar a prevalência de paratuberculose em vea-

dos e javalis, foram realizadas necropsias a 877 veados e 589 javalis e foram feitas colheitas de vários órgãos para posterior pesquisa de MAP utilizando técnicas de biologia molecular, microbiologia e histopatologia. MAP foi detetado por PCR IS900 em 81.1% das amostras de rim de veado positivas no esfregaço de Ziehl-Neelsen. Em relação aos javalis 45 animais foram classificados como infetados por cultura bacteriológica e/ou PCR e de acordo com os resultados obtidos, 37.9% dos javalis infetados foram aprovados para consumo humano.

A ocorrência de carnívoros selvagens infetados por MAP, neste estudo, numa amostra de 74 animais mortos por atropelamento, foi de 27% (n=20). MAP foi isolado pela primeira vez, em Portugal, na raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), na fuínha (*Martes foina*), na lontra europeia (*Lutra lutra*), no mangusto (*Herpestes ichneumon*), e no texugo europeu (*European badger*). A presença de MAP foi confirmada por cultura bacteriológica e detetada por biologia molecular em múltiplos órgãos, das várias espécies animais.

Também, neste trabalho, foi realizada a pesquisa de anti-corpos contra as espécies do complexo *Mycobacterium avium* em mamíferos selvagens mortos por atropelamento, encontrados mortos ou resultantes da atividade cinegética. A seroprevalência resultante foi de 4.7% e os anticorpos contra MAC foram detetados em raposa vermelha, lontra europeia (*Lutra lutra*), texugo europeu (*Meles meles*) e javali (*Sus scrofa*).

Em relação às várias lesões granulomatosas observadas, foi avaliada a resposta inflamatória crónica nos gânglios mesentéricos de javalis com linfadenite granulomatosa. Os parâmetros morfológicos das lesões foram registados e foi avaliada a expressão dos anticorpos anti-CD3 e anti-CD79 α . Os granulomas observados encontravam-se principalmente no estadio III e IV e as percentagens e padrões de distribuição de anti-CD3 e anti-CD79 α foram semelhantes em lesões onde MAP e MTC estavam presentes.

Resultado da análise dos gânglios linfáticos de veados com lesões granulomatosas foi observada a presença de co-infeção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, e MAP confirmada por biologia molecular, esta co-infeção foi descrita pela primeira vez, neste trabalho.

Também foi realizada a pesquisa de *Nocardia* spp., utilizando as duas metodologias (PCR e cultura bacteriana) em gânglios linfáticos de javalis com linfadenite granulomatosa, mas com resultados negativos na cultura micobacteriana e PCR, e obtiveram-se duas amostras positivas em PCR. Este é o primeiro caso documentado de nocardiose em javalis e estes resultados realçam a necessidade do diagnóstico diferencial das lesões granulomatosas em animais selvagens.

A informação incluída neste trabalho pode ser utilizada como orientação para novas pesquisas abrangendo vários campos, seja para prosseguir os estudos sobre micobacterioses em mamíferos selvagens como para expandir a pesquisa para outras espécies animais e para outras áreas geográficas.

Os ungulados selvagens apresentam uma grande variabilidade na demografia, gestão, exposição a agentes patogénicos e interação com outros animais selvagens, domésticos e o Homem. Em Portugal, existe a noção que a densidade de animais selvagens como do veado e do javali tem vindo a aumentar nas últimas décadas, mas não existem *census* atualizados destas populações e é necessário saber o tamanho da população, para calcular a amostra necessária ao cálculo da prevalência das micobacterioses.

Também em Portugal, existem poucos dados úteis sobre a prevalência da paratuberculose em rebanhos de ovinos e em bovinos e sobre a tuberculose em rebanhos de caprinos, nem do risco para outras espécies animais.

A adoção de práticas laboratoriais que resultam da combinação dos métodos tradicionais de cultura e métodos moleculares melhoram não só o diagnóstico das micobacterioses nos animais selvagens como a epidemiologia associada. Os métodos moleculares, quando comparados com os métodos tradicionais de cultura melhoram o conhecimento da diversidade e abundância das micobactérias na vida selvagem.

Assim, este trabalho estabeleceu uma base de conhecimento adequado para uma avaliação inicial, mas novas investigações são necessários, a fim de completar o quadro das micobacterioses na vida selvagem e para estabelecer as respetivas medidas de controlo.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto PEst-OE/AGR/UI0772/2014 (financiado pela FCT) e pela bolsa de investigação SFRH/PROTEC/50224/2009 FCT-CECAV (Programa especial de apoio à formação avançada de docentes do ensino superior politécnico).

Agradeço às minhas Orientadoras de Doutoramento Professora Doutora Ana Cláudia Coelho, Professora Doutora Maria de Lurdes Pires e Professora Doutora Manuela Matos.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco, à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e ao Centro de Estudos de Ciências Animais e Veterinárias (CECAV).

Aos Colegas Médicos Veterinários Luis Figueira, Henrique Domingues

e João Cerejo e às Associações de Caça da região.

Aos funcionários da Escola Superior Agrária de Castelo Branco Maria Helena Martins e Paulo Mateus e a todos os Co-autores dos artigos publicados resultantes deste trabalho, pela sua importante contribuição.

Bibliografia

- Coelho, A.C., Pinto, M.L., Coelho, A.M., Rodrigues, J., Juste, R. (2008). Estimation of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR in sheep blood. *Small Ruminant Research* 76: 201-206.
- de Lisle, G.W., Bengis, R.G., Schmitt, S.M., O'Brien, D.J. (2002). Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 21: 317-334.
- Euzéby, J.P. (2015) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
- Falkinham, J.O., 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 177-215.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 7877-7882.
- Matos, A.C., Figueira, L., Martins, M.H., Matos, M., Andrade, S., Álvares, S., Mendes, A., Sousa, N., Coelho, A., Pinto, M.L. (2013). Granulomatous lesions and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Portuguese wild boars (*Sus scrofa*). *Journal of Comparative Pathology* 148: 85.
- Miranda, A., Pires, M.A., Pinto, M.L., Sousa, L., Sargo, R., Rodrigues, J., Coelho, A.C., Matos, M., Coelho, A.C. (2009). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a diamond sparrow. *Veterinary Record* 165: 184.
- Mostowy, S., Behr, A.M. (2005). The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinics in Chest Medicine* 26: 207-216.
- Santos, N., Correia-Neves, M., Ghebremichael, S., Källenius, G., Svenson, S.B., Almeida, V., (2009). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases* 45: 1048-1061.
- Tell, L.A., Leutenegger, C.M., Scott Larsen, R., Agnew, D.W., Keener, L., Needham, M.L., Rideout, B.A. (2003). Real-time polymerase chain reaction testing for the detection of *Mycobacterium genavense* and *Mycobacterium avium* complex species in avian samples. *Avian Diseases* 47: 1406-1415.
- Thorel, M.-F., Krichevsky, M., Vincent Lévy-Frébault, V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended and description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40: 254-260.
- Turenne, C.Y., Wallace, R., Behr, M.A. (2007). *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 205-229.
- Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., Barnard, M., Hesseling, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M.C., Chege, G.K., Victor, T.C., Hoal, E.G., van Helden, P.D. (2006). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 10: 818-822.