

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE
MYCOBACTERIUM, E DOS GENES DE VIRULÊNCIA *vapA*, *vapB* E *vapN*
EM LINHAGENS DE *RHODOCOCCUS EQUI*, ISOLADAS DE
LINFONODOS DE TAIASSUÍDEOS DE CATIVEIRO

AMANDA BONALUME CORDEIRO DE MORAIS

Botucatu – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE
MYCOBACTERIUM, E DOS GENES DE VIRULÊNCIA *vapA*, *vapB* E *vapN*
EM LINHAGENS DE *RHODOCOCCLUS EQUI* ISOLADAS DE
LINFONODOS DE TAIASSÚIDEOS DE CATIVEIRO

AMANDA BONALUME CORDEIRO DE MORAIS

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para a obtenção do título de
doutor.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Morais, Amanda Bonalume Cordeiro de.

Ocorrência e detecção molecular de espécies de *Mycobacterium*, e dos genes de virulência *vapA*, *vapB* e *VapN* em linhagens de *Rhodococcus equi*, isoladas de linfonodos de taiassuídeos de cativeiro / Amanda Bonalume Cordeiro de Moraes. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. *Rhodococcus equi*. 2. Doenças micobacterianas.
3. Queixada. 4. Micobactérias.

Palavras-chave: Cateto; Espécies de Tayassuidae;
Micobactérias; Queixada; Rodococose.

Nome do Autor: Amanda Bonalume Cordeiro de Moraes

Título: OCORRÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *MYCOBACTERIUM*, E DOS GENES DE VIRULÊNCIA *vapA*, *vapB* E *vapN* EM LINHAGENS DE *RHODOCOCCLUS EQUI* ISOLADAS DE LINFONODOS DE TAIASSUÍDEOS DE CATIVEIRO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dr. Helio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FCAV – UNESP – Jaboticabal, SP.

Prof. Dr. Rogério Giuffrida

Membro

Curso de Medicina Veterinária

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Data da Defesa: 14/07/2017

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Albérico e Áurea que sempre me apoiaram
incondicionalmente.*

*Ao Marcel, um companheiro de vida que agradeço
imensamente por ter ao meu lado.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, um exemplo de profissional e ser humano. Muito obrigada pelo apoio e dedicação.

Agradecimentos

Às minhas irmãs Andrea e Alessandra, que mesmo distantes estão sempre presentes.

Aos amigos de toda uma vida Thamyres Dalethese, Bruna Maciel, Suzana Braz e Carol Azevedo. Vocês são essenciais.

Aos pós-graduandos Ana Carolina, Carmen, Gustavo, Rafaela, Carol Lechinsck e Simony. Tudo se tornou mais leve por conta das nossas risadas e companheirismo do dia a dia.

Ao Fernando Listoní, você foi o precursor de tudo. Muito obrigada, não somente, por todo o apoio ao desenvolvimento deste trabalho, como também pelo carinho e amizade ao longo de todos esses anos. Devo a você a profissional qualificada que me tornei.

Aos Professores, Marcos Bryan e Shinji Takai pela cooperação com este projeto.

À Cássia Ikuta, muito obrigada por toda a ajuda, amizade e paciência.

À CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tamanho em pares de base dos produtos amplificados, sequência e *primers* utilizados, e genes alvos para a identificação de micobactérias em linfonodos de taiassuídeos pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (TB-PCR). Botucatu, SP, 2016-2017.....35

Quadro 2 - *Primers* utilizados nas reações de RD PCR multiplex para a identificação de micobactérias em linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.....36

Quadro 3 - Tamanho dos produtos amplificados em pares de base utilizados para a identificação de micobactérias em linfonodos de taiassuídeos pela técnica de RD PCR multiplex. Botucatu, SP, 2016-2017.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolamento de <i>Mycobacterium</i> spp. e <i>Rhodococcus equi</i> em linfonodos submandibulares, mediastínicos e mesentéricos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016 – 2017.....	42
Tabela 2 - Caracterização molecular pela técnica de PCR-PRA de espécies do gênero <i>Mycobacterium</i> em 10 isolados obtidos de linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016 – 2017.....	43
Tabela 3 - Identificação, espécie, tempo de isolamento, tamanho de fragmento amplificado pelas enzimas de restrição e espécies de micobactérias identificadas no cultivo microbiológico e PCR-PRA em linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016 – 2017	44
Tabela 4 - Espécies de micobactérias identificadas por sequenciamento utilizando o gene <i>hsp65</i> , medidas estatísticas de significância, número de acesso e fonte de isolamento da espécie de referência, em isolados obtidos linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016 – 2017.....	45
Tabela 5 - Espécies de micobactérias identificadas por sequenciamento utilizando o gene <i>rpob</i> , medidas estatísticas de significância, número de acesso e fonte de isolamento da espécie de referência, em isolados obtidos linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.....	46
Tabela 6 - Comparação das espécies de micobactérias, identificadas por PCR-PRA e sequenciamento dos genes <i>hsp65</i> e <i>rpob</i> , em isolados obtidos de linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação filogenética, do gene *hsp65*, entre espécies de micobactérias (*M. sinense*, *M. colombiense*, *M. intracellulare* e *M. kumamotoense*.) identificadas em linfonodos de taiassuídeos.. Botucatu, SP, 2016-2017.....47

Figura 2 - Relação filogenética, do gene *rpob*, entre espécies de micobactérias (*Mycobacterium* spp., *M. colombiense*, *M. intracellulare* e *M. kumamotoense*.) identificadas em linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016 - 2017.....48

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

μm = micrômetro

Aids = Acquired immunodeficiency syndrome

BAAR = Bacilo Álcool-ácido resistente

CAZ-NB = meio de cultura composto por ceftazidima, novobiocina e ciclohexamida

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

CMT = espécies pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*

CTAB = solução de brometo de cetiltrimetilamônio

DHVSP = Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ha = hectare

HIV = Human deficiency vírus

hsp65 = proteína de choque térmico 65

IBAMA = Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUCN = União Internacional para a Conservação da Natureza

Kb = kilobase

KDa = quilo Dalton

MAC = *Mycobacterium avium* complex

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PB = pares de bases

pmole = picomol

PCR = Polymerase chain reaction

PRA = Pattern Restriction Analysis

RD = Regiões de diferença

RENTAS = Rede Nacional de Combate ao Tráfico de animais Silvestres

SDS = dodecil sulfato de sódio

TB = Tuberculose

Vap = virulence associated protein

WHO = World Health Organization

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1. Aspectos dos taiassuídeos de vida livre e da criação em cativeiro	7
2.1.1 Família Tayassuidae.....	7
2.1.2 Distribuição geográfica e habitat	7
2.1.3 Criação dos taiassuídeos em cativeiro	8
2.1.4 Taiassuídeos no Brasil	9
2.1.4.1 <i>Tayassu tajacu</i>	9
2.1.4.2 <i>Tayassu pecari</i>	10
2.1.4.3 Status e conservação	10
2.1.4.4 Instalações e Manejo.....	11
2.1.5. Principais doenças de origem infecciosa	12
2.2 Rodococose.....	13
2.2.1 Propriedades gerais de <i>R. equi</i>	13
2.2.2 Virulência	14
2.2.2.1 Linhagens virulentas (VapA)	15
2.2.2.2 Linhagens de virulência intermediária (VapB).....	16
2.2.2.3 Linhagens avirulentas.....	16
2.2.2.4 Linhagens VapN.....	17
2.2.3 Rodococose em animais domésticos.....	18
2.2.4 Rodococose em suídeos.....	18
2.2.5 Rodococose humana.....	20
2.3 Micobacterioses.....	22

2.3.1 Propriedades gerais das micobactérias.....	22
2.3.2 Micobacterioses em animais domésticos.....	23
2.3.3 Micobacterioses em animais silvestres	23
2.3.4 Micobacterioses em suídeos.....	24
2.3.5 Micobacterioses e tuberculose em humanos	26
3. HIPÓTESES DE ESTUDO	28
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1. Animais, colheita de material e universo amostral.....	30
5.2. Cultivo microbiológico para isolamento de <i>R. equi</i>	30
5.2.1 Caracterização da hemólise sinérgica (“fator equi”).....	31
5.2.2 Determinação de antígenos e plasmídeos de virulência	31
5.2.2.1 Extração de DNA dos plasmídios.....	31
5.2.2.2 Reação em cadeia pela polimerase.....	31
5.3. Identificação microbiológica de micobactérias	32
5.4 Extração e purificação de DNA	33
5.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	34
5.5.1 TB PCR Multiplex.....	34
5.5.2 RD PCR Multiplex	35
5.5.3 PCR com análise de restrição enzimática (PRA).....	37
5.5.4 Eletroforese.....	38
5.5.5 Sequenciamento	38
5.5.6 Edição e análise das sequências	38
5.5.7. Análise das sequências, construção da árvore filogenética	39
5.6 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	39
5.7 Autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.....	39

5.8 Análise estatística.....	39
6. RESULTADOS	40
6.1 <i>Rhodococcus equi</i>	40
6.1.2 Diagnóstico microbiológico	40
6.1.3 Proteínas associadas a virulência (Vap)	41
6.2 Micobactérias	41
6.2.1 Diagnóstico microbiológico	41
6.3 Isolamento de <i>R. equi</i> e Micobactérias	42
6.4 Detecção molecular de micobactérias	43
6.4.1 PCR-PRA	43
6.2.2 Sequenciamento.....	44
6.2.2.1 Árvore Filogenética	46
6.2.2.2 Concordância de detecção das espécies de micobactérias nos testes moleculares	48
7. DISCUSSÃO	50
8. CONCLUSÕES.....	55
9. REFERÊNCIAS	56
10. ANEXO	72
10.1 Anexo 1 - Permissão de importação do Ministério da Agricultura, Florestal e da Pesca do Japão.....	72
10.2 Anexo 2 - Certificado Zoosanitário Internacional para exportação de microorganismos emitido pelo MAPA, Brasil.....	73
11. ARTIGO CIENTÍFICO	74

MORAIS, A.B.C. **Ocorrência e detecção molecular de espécies de *Mycobacterium*, e dos genes de virulência *vapA*, *vapB* e *VapN* em linhagens de *Rhodococcus equi*, isoladas de linfonodos de taiassuídeos de cativeiro.** Botucatu, 2017. 71p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Foram investigadas, neste estudo, proteínas associadas à virulência (genes *vapA*, *vapB* e *vapN*) das espécies de *Rhodococcus equi* e Micobactérias isoladas de 330 linfonodos de catetos (*Tayassu tajacu*) e queixadas (*Tayassu pecari*) destinados ao consumo humano. Trinta e seis (10,9%) linhagens de *R. equi* foram isoladas, 3,3% (11/330) dos linfonodos de queixadas e 7,6% (25/330) dos catetos. Entre os 11 isolados de *R. equi* das queixadas, 90,9% (n=10/11) foram obtidos de linfonodos mesentéricos e apenas 9,1% (n=1/10) de linfonodo mediastínico. Nos 25 isolados de *R. equi* dos catetos, 40,0% (10/25) foram obtidos de linfonodos mesentéricos, 36,0% (9/25) de submandibulares e 24,0% (6/25) de mediastínicos. Não foram identificados genes *vapA*, *vapB* e *vapN* entre os isolados de *R. equi*. Foi isolado *Mycobacterium* sp. de 3,03% (10/330) do total de linfonodos. Entre os 10 isolados de micobactérias, 60% (n=6/10) dos linfonodos eram de queixadas e 40% (4/10) de catetos. Dez espécies de *Mycobacterium* foram detectadas por PCR-PRA, com predominância de *M. avium* tipo 1. O sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpob* revelaram micobactérias saprófitas (*M. sinense*, *M. kumamotoense*) e potencialmente patogênicas (*M. colombiense*, *M. intracellulare*) para humanos e animais. Esta é a primeira descrição de *R. equi* e / ou espécies de micobactérias identificadas nos linfonodos de espécimes de Tayassuídeos. Apesar da ausência de genes *Vap*, a identificação de *R. equi*, bem como de micobactérias não tuberculosas e saprófitas, destacam o risco de transmissão desses patógenos das espécies de Tayassuídeos para humanos por meio de carne ou produtos à base de carne contaminados com conteúdo de linfonodos, uma vez que *R. equi* sem plasmídeo de virulência e as espécies de micobactérias descritas aqui já foram relatadas como causas de infecções pulmonares e extrapulmonares em seres humanos imunocompetentes e imunocomprometidos.

Palavras-chave: espécies de *Tayassuidae*, cateto, queixada, micobactérias, rodococose.

MORAIS, A.B.C. **Occurrence and molecular detection of *Mycobacterium* species, and the virulence-associated proteins (*vapA*, *vapB* and *vapN* genes) in strains of *Rhodococcus equi*, isolated from the lymph nodes of captive *Tayassuidae* species.** Botucatu, 2017. 71p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Virulence-associated proteins (*vapA*, *vapB* and *vapN* genes) of *Rhodococcus equi* and *Mycobacterium* species isolated from 330 lymph nodes of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) and white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) intended for human consumption were investigated. Thirty-six (10.9%) *R. equi* strains were isolated, 3.3% (11/330) from white-lipped peccary and 7.6% (25/330) of collared peccary lymph nodes. Among the 11 isolates of *R. equi* of the white-lipped peccaries, 90.9% (n = 10/11) were obtained from mesenteric lymph nodes and only 9.1% (n = 1/10) of the mediastinal lymph node. In the 25 isolates of *R. equi* obtained from collared peccaries, 40.0% (10/25) were recovered from mesenteric lymph nodes, 36% (9/25) from submandibular, and 24.0% (6/25) from mediastinal ones. No *vapA*, *vapB*, and *vapN* genes (plasmidless type) were identified among *R. equi* isolates. *Mycobacterium* sp. was isolated in 3.03% (10/330) of all lymph nodes analyzed. Among the 10 mycobacterial isolates, 60% (n = 6/10) were from white-lipped peccary, and 40% (4/10) from collared peccary lymph nodes. Ten *Mycobacterium* species were detected by PCR-PRA, with predominance of *M. avium* type 1. Sequencing of *hsp65* and *rpoB* genes revealed mycobacteria that were saprophytic (*M. sinense*, *M. kumamotoense*) and potentially pathogenic (*M. colombiense*, *M. intracellulare*) to humans and animals. To our knowledge, this is the first description of *R. equi* and/or mycobacteria species identified in the lymph nodes of *Tayassuid* specimens. Despite the absence of *Vap* genes, the identification of *R. equi*, as well as nontuberculous and saprophytic mycobacteria highlight the risk of transmission of these pathogens from *Tayassuidae* species to humans by means of meat or meat products contaminated with lymph node contents, since *R. equi* plasmidless type and mycobacterial species described here have been reported as causes of pulmonary and extrapulmonary infections both in immunocompetent and immunocompromised humans.

Keywords - *Tayassuidae* species, collared peccary, white-lipped peccary, mycobacteria, rhodococcosis.

1. INTRODUÇÃO

Tayassu tajacu e *Tayassu pecari*, também conhecidos como cateto e queixada, ou popularmente denominados de “porcos do mato”, são taiassuídeos pertencentes à fauna brasileira. A criação em cativeiro dos taiassuídeos tem aumentado em todo o mundo, visto que é crescente a demanda mundial do consumo de carne de animais silvestres em restaurantes especializados. Ainda, em certas regiões, essas espécies são consideradas como fonte alternativa de proteína de origem animal para os humanos (CUBAS et al., 2006). Nas últimas décadas, a adaptação da criação de certas espécies silvestres aos sistemas de criação em cativeiro tornou mais sustentável e economicamente viável, o comércio de produtos e subprodutos desses animais (ODA et al., 2004).

No Brasil, existem várias espécies de animais silvestres com potencial para a criação de modo racional visando à produção de proteína de origem animal. Porém, são necessários estudos detalhados que indiquem o impacto ambiental, a viabilidade econômica e o risco sanitário que representam as criações de animais silvestres em cativeiro (ODA et al., 2004). Na Amazônia brasileira, a caça de subsistência representa grande parte da disponibilidade proteica da alimentação de famílias rurais (OLIVEIRA e MELO, 1999; ROBINSON e BODMER, 1999; BODMER, 2000; FUCCIO et al., 2003). Nas regiões de antiga e recente colonização brasileira, encontram-se várias espécies silvestres como paca, cutia e capivara, além de ungulados como cateto, queixada e veado, que contribuem significativamente para a alimentação das populações desfavorecidas, ou com menos acesso aos produtos comercializados de animais de produção (VEIGA et al., 1995; BODMER et al., 1997; OLIVEIRA e MELO, 1999).

A procura de animais silvestres, particularmente de cateto e queixada, tem aumentado no mercado de carnes exóticas. A carne destas espécies silvestres apresenta menor teor de gordura se comparada aos suínos domésticos. O couro dos taiassuídeos possui grande valor comercial e é utilizado, principalmente, para a confecção de vestimentas, acessórios de uso pessoal e outros artigos de luxo (SOWLS, 1984). Nogueira Filho et al. (2004) ressaltaram a crescente demanda de

consumo de carne de cateto e queixada para as populações de alta renda, que possuem o hábito de consumir carnes de animais silvestres ou exóticos.

Na criação de taiassuídeos em cativeiro, deve-se levar em consideração aspectos de saúde, pois estes animais podem ser portadores ou reservatórios de patógenos de potencial zoonótico. Em geral, os taiassuídeos de vida livre e criados em cativeiro são suscetíveis às doenças infecciosas que acometem os suínos domésticos, apesar de variações na prevalência das doenças de acordo com a região geográfica, habitat dos animais e contato com espécies domésticas (CUBAS et al., 2006).

Apesar da receptividade do mercado consumidor nas últimas décadas ao consumo de carne de animais silvestres, incluindo taiassuídeos, os estudos sobre a qualidade da carcaça são praticamente incipientes, bem como a oferta de carne dessas espécies é baixa e instável (ODA et al., 2004). Dentre as principais doenças infecciosas que acometem os suídeos no Brasil e em todo o mundo, merece destaque a linfadenite granulomatosa.

Esta afecção comumente é diagnosticada na linha de abate e determina elevados prejuízos econômicos aos produtores e a indústria, em virtude da condenação total ou parcial de carcaças (SILVA et al., 2000). A linfadenite granulomatosa representa também impacto significativo no contexto de Saúde Pública, em razão do potencial zoonótico dos agentes causais da doença, principalmente para pessoas imunossuprimidas (ACHA e SZYFRES, 2003). Particularmente no Brasil, estudo realizado na região Sul estimou entre 6,9 a 8,0 milhões de reais os prejuízos para a suinocultura decorrente da linfadenite granulomatosa (MARTINS et al., 2001).

Os principais micro-organismos encontrados em linfonodos aparentemente normais ou com linfadenite em suínos são *Mycobacterium* sp. e *Rhodococcus equi* (*R. equi*) (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; LARA et al., 2009). A prática de condenação total ou parcial de carcaças de suínos com lesões granulomatosas ou piogranulomatosas em linfonodos - também denominada "lesões tuberculóides" - é justificada em razão do risco zoonótico das micobactérias e *R. equi*, bem como da impossibilidade de distinguir, na linha de abate, lesões similares causadas por outros micro-organismos como estafilococos, estreptococos,

enterobactérias e certos actinomicetos (LARA, 2013). No entanto, na literatura consultada, não foram encontrados estudos investigando a presença de microorganismos em linfonodos de suínos, com ou sem lesões, particularmente de potencial zoonótico.

O gênero *Mycobacterium* contempla várias espécies classificadas em três grupos de relevância em saúde animal e saúde pública: (1) patógenos obrigatórios de humanos e animais, (2) micobactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos (oportunistas) e (3) espécies saprófitas ou ubíquas. *M. avium* subespécie *avium* (*M. avium*) pertence ao complexo *Mycobacterium avium intracellulare* (SATANFORD e STANFORD, 2012), é classificado como micobactéria potencialmente patogênica ou oportunista, e tem sido identificado como o principal agente da linfadenite em suínos (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007; FERREIRA NETO e OLIVEIRA, 2016).

Neste contexto, Pate et al. (2004) cultivaram 260 linfonodos de suínos com lesões granulomatosas obtidos em abatedouros, e identificaram 123 (47,3%) isolados de *M. avium* e 71 (27,3%) de *R. equi* na Eslovênia. No Brasil, de 129 linfonodos de suínos com e sem lesões, e em 60 linfonodos de javalis com e sem lesões, houve predomínio na identificação de *Mycobacterium avium* e *R. equi* em amostras com e sem linfadenite (LARA et al., 2011), confirmando o predomínio desses agentes na etiologia da linfadenite em suínos.

Em humanos, *M. avium* causa principalmente pneumonia e, menos frequentemente, infecções extrapulmonares (ACHA e SZYFRES, 2003), particularmente em pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (Human Immunodeficiency Virus-HIV) / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (acquired immunodeficiency syndrome-Aids) (WHO, 2016).

R. equi são bactérias oportunistas, eliminadas pelas fezes de animais de produção, associadas principalmente a pneumonia piogranulomatosa, colite e linfadenite mesentérica em potros (RIBEIRO e VARGAS, 2016).

As infecções por *R. equi* em suínos geralmente estão restritas ao trato linfático, manifestadas sob a forma de linfadenite, acometendo principalmente os linfonodos submandibulares e mediastínicos (LARA et al., 2011), identificados predominantemente no momento do abate (PRESCOTT, 1991). Nas últimas décadas, três níveis de virulência de *R. equi* têm sido reconhecidos, com base na

presença de proteínas associadas à virulência (Virulence associated protein-Vap), denominados VapA (virulentos), VapB (virulência intermediária) e avirulentos, codificadas em plasmídios (TAKAI, 1997). Isolados VapA predominam na pneumonia em potros, enquanto estirpes VapB têm sido encontradas frequentemente em linfonodos de suídeos e em pacientes humanos imunossuprimidos (MEIJER e PRESCOTT, 2004). Recentemente, novo perfil de virulência foi reconhecido denominado VapN, ou “tipo bovino”, encontrado em pacientes humanos e em bovinos (VALERO-RELLO et al., 2015). *R. equi* avirulentas não apresentam Vap e são encontradas nas fezes e no ambiente de animais de produção, em parques e praças de entretenimento humano e, também, causando rodococose em humanos com e sem imunossupressão (TAKAI et al., 2003; RIBEIRO e VARGAS, 2016).

No Japão, Takai (1997) descreveu o predomínio da detecção de linhagens de virulência intermediária (VapB) em *R. equi* isolados de linfonodos de suínos ao abate, e ressaltou para a similaridade deste perfil com linhagens de origem humana, particularmente em pessoas vivendo com HIV/Aids, apesar da ausência de histórico de contato dos indivíduos com suínos ou ambiente dos criatórios. Estudos subsequentes na Tailândia (TAKAI et al., 2003) e no Brasil (RIBEIRO et al., 2011a) também detectaram o predomínio de isolados de virulência intermediária em *R. equi* obtidos de linfonodos de suínos ao abate.

Particularmente no Brasil, estudo conduzido com 20 isolados de *R. equi* obtidos de humanos identificou o predomínio de linhagens VapB tipo 8 em cinco pacientes vivendo com HIV/Aids (RIBEIRO et al., 2011b), notadamente o mesmo perfil de virulência (VapB tipo 8) identificado no país em linfonodos de suínos e javalis (RIBEIRO et al., 2011a) e em casos de pneumonia em javalis (VARGAS et al., 2013). A ausência ou inconsistência de histórico de contato dos pacientes humanos com suínos ou com os criatórios aventou a possibilidade da infecção humana com *R. equi* pelo consumo de carne crua ou malpassada de suídeos, contaminada cruzadamente pelo conteúdo dos linfonodos ou pelas fezes no momento do abate, posto que *R. equi* é eliminado pelas fezes de animais domésticos (TAKAI et al., 2003). Nesse contexto, LARA et al. (2015) confirmaram a detecção de *R. equi* VapB tipo 8 nas fezes e em linfonodos de suínos abatidos no interior do estado de São Paulo, fato que poderia explicar, em parte, a infecção de pacientes humanos com

linhagens de virulência intermediária em pacientes sem histórico de contato com criação de suínos. No entanto, são incipientes ou praticamente inexistentes os estudos conduzidos na identificação de *R. equi*, tampouco de micobactérias, em linfonodos de taiassuídeos utilizados para o consumo humano, bem como do perfil de virulência dos isolados de *R. equi*.

Diante do aumento da criação de taiassuídeos em cativeiros, da demanda crescente de carne de cateto e queixada para restaurantes especializados em carnes exóticas ou do consumo dessas espécies na caça de subsistência, o presente estudo investigou a ocorrência de *Rhodococcus equi* e de genes associados à virulência (*vapA*, *vapB* e *vapN*), além das principais espécies do gênero *Mycobacterium*, em linhagens isoladas de linfonodos de catetos e queixadas utilizados para consumo humano.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos dos taiassuídeos de vida livre e da criação em cativeiro

2.1.1 Família Tayassuidae

As espécies *Tayassu tajacu* (cateto), *Tayassu pecari* (queixada) e *Catagonus wagneri* são agrupadas na família Tayassuidae, ordem Artiodactyla, subordem Suiformes, superfamília Suoidea, e pertencem a fauna brasileira. A superfamília Suoidea é subdividida em duas famílias distintas: Tayassuidae e Suidae, cuja divisão é baseada em diferenças de ordem anatômica e genética entre os animais (SILVA, 1984). Apesar do cateto e queixada serem popularmente conhecidos como “porcos-do-mato”, e *Catagonus wagneri* como “porco-do-chaco”, essas espécies não pertencem à família Suidae, que é composta pelo suíno (porco) doméstico (*Sus domesticus*) e javali (*Sus scrofa scrofa*) (CUBAS et al., 2006).

2.1.2 Distribuição geográfica e habitat

Os taiassuídeos possuem uma distribuição limitada ao Novo Mundo. Os catetos são encontrados desde o sul dos EUA ao norte da Argentina, enquanto as queixadas ocorrem do Sul do México até o norte da Argentina (SOWLS, 1997).

Essas espécies possuem como habitat natural as florestas. Os catetos podem ser encontrados desde as florestas tropicais úmidas até regiões desérticas. Também habitam ilhas próximas ao continente, como no Caribe. Na ilha de Cuba, estes animais foram introduzidos pelos humanos (BODMER e SOWLS, 1993). Queixadas podem estar presentes em regiões de clima árido, porém seu habitat preferencial são as florestas tropicais úmidas, geralmente próximos a cursos d'água. Sobrevivem bem em áreas conservadas. No entanto, não se adaptam a áreas desmatadas onde facilmente são expostos a predação e caça (DEUSTSCH, 1990). Ambas as espécies possuem comportamentos sociais, pois convivem em grupos compostos por espécies de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos (CUBAS et al., 2006). O acesso dos taiassuídeos a plantações de cereais, frutas e hortaliças tem gerado, recentemente em certas regiões, problema social, econômico e ambiental, devido ao prejuízo causado aos agricultores e hortifrutigranjeiros.

2.1.3 Criação dos taiassuídeos em cativeiro

A criação em cativeiro dos taiassuídeos tem-se difundindo nas últimas décadas em vários países, devido a crescente demanda de carnes exóticas, apreciada principalmente por frequentadores de restaurantes requintados. Apresenta menor teor de gordura se comparada aos suínos domésticos. Ainda, constitui-se uma alternativa de consumo proteico para a alimentação humana em certas regiões, pela caça de subsistência, pois servem como alimento para populações menos privilegiadas, com menor acesso a carne de origem bovina, suína e/ou de aves (NOGUEIRA et al., 2004).

Como os taiassuídeos pertencem ao grupo de animais silvestres, os criatórios comerciais requerem cuidados especiais, e são autorizados e monitorados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA (CUBAS et al., 2006). Segundo a PORTARIA IBAMA Nº 118-N, DE 15 DE OUTUBRO DE 1997, é facultado ao IBAMA, sempre que necessário, exigir do criadouro a colocação do quantitativo de espécimes, ou parte dele, à disposição, para atender programas de reintrodução ou para a implantação de novos criadouros que tenham importância e caráter social, comunitário ou demonstrativo.

A crescente demanda no mercado por estes animais silvestres exige a implantação de programas de manejo, reprodutivos e de saúde nos criadouros, visando à criação em cativeiro de modo sustentável, economicamente viável e com níveis adequados de biossegurança, bem como o conhecimento dos riscos destas espécies como fontes de infecção de micro-organismos para animais domésticos e humanos.

2.1.4 Taiassuídeos no Brasil

2.1.4.1 *Tayassu tajacu*

O cateto é o menor das três espécies pertencentes à família Tayassuidae. Pesa entre 18 e 25 Kg e a altura varia de 40 a 50 cm. Usualmente as fêmeas são pouco menores do que os machos (DEUTSCH, 1990). Vivem em pequenos grupos, de 5 a 15 animais. A união do grupo é mantida por vocalização e forte odor exalado por glândula dorsal (BODMER e SOWLS, 1993). Possuem pelagem cinza-escuro com faixa dorsal mais escura e pelos esbranquiçados no pescoço, característica que facilita o reconhecimento da espécie. Entretanto, a pelagem pode apresentar algumas variações, influenciada pelo ambiente e habitat do animal. Tais variações na pelagem sugerem a presença de subespécies (SILVA, 1984).

Com efeito, a taxonomia desta espécie é objeto de controvérsia. Certa linha de pesquisadores considera estes animais pertencentes ao gênero *Pecari*, espécie *tajacu*, que seria diferente do *Tayassu* (THEIMER et al., 1998, GONGORA et al., 2002). Foi descrito com base na análise de sequências do DNA mitocondrial, que as espécies *Tayassu pecari* e *Catagonus wagneri* são mais próximas se comparadas ao *Pecari tajacu* (ou *Tayassu tajacu*). Tal fato reforça a evidência que estes animais pertencem ao gênero *Pecari*, distinto do *Tayassu* (THEIMER et al., 1998, GONGORA et al., 2002). Estes estudos revelam a necessidade de investigações taxonômicas com base genética e da distribuição geográfica destas espécies.

Os catetos necessitam de área territorial um pouco menor quando comparados aos queixadas. A área ocupada pelo grupo pode variar de 60 a 400 ha, cuja extensão média de habitat é de 100 a 200 ha (DEUTSCH, 1990). A dieta varia de acordo com o tipo de habitat dos animais, compreendida principalmente por raízes, nozes e plantas. Quando habitam florestas, geralmente se alimentam de

frutos de palmeiras e invertebrados. O padrão de atividade também vai variar de acordo com o habitat, porém usualmente possuem hábito crepuscular, se alimentando nas primeiras horas da noite (CUBAS et al., 2006).

Atualmente esta espécie está ameaçada devido à caça predatória e a destruição do meio ambiente, que determinam a fragmentação de populações destes animais, podendo levar a extinção em certas regiões tradicionais de distribuição da espécie (BODMER e SOWLS, 1993).

2.1.4.2 *Tayassu pecari*

As queixadas são maiores e mais pesadas se compradas aos catetos. Pesam entre 30 e 50 Kg, com altura média de 110 cm. É considerada a espécie mais agressiva dos “porcos selvagens” sul-americanos. Formam grupos grandes e coesos, entre 50 e 100 animais (CUBAS et al., 2006). A pelagem é rajada, alternada de preto e marrom. Os filhotes apresentam pelagem bege e marrom-avermelhada que se torna mais escura quando atingem a idade adulta (MAYER e WETZEL., 1987).

Essa espécie necessita de área territorial mais extensa. Foi estimado que, na Mata Atlântica, ocupam 1.871 hectares em áreas fragmentadas (KEUROGHLIAN et al., 2009) e 20.000 hectares em florestas úmidas na Amazônia (FRAGOSO, 2004). À semelhança dos catetos, também possuem glândula localizada no dorso que exala secreção de forte odor, liberada para marcação territorial e reconhecimento dos animais do grupo (CUBAS et al., 2006). São frugívoros, porém podem se alimentar de outros animais (DEUTSCH, 1990). Possuem comportamento expansivo e agressivo. Quando acuados, batem fortemente o queixo, característica peculiar que gerou o nome popular de queixada (GONELA, 2003).

Populações indígenas neotropicais e rurais usam a queixada como fonte de alimento e renda (FRAGOSO, 2004). Apesar de relativamente agressiva, esta espécie é considerada mais vulnerável à caça do que os catetos, pois formam grupos sociais maiores (BODMER e SOWLS, 1993).

2.1.4.3 Status e conservação

As queixadas foram classificadas como vulneráveis a extinção na lista vermelha das espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da

Natureza (IUCN), pois a população está continuamente em declínio. A perda e fragmentação de habitat, aliada a caça predatória, são consideradas as principais causas da redução das populações da espécie (KEUROGHLIAN et al., 2013). Os catetos estão classificados como espécie de menor preocupação na lista IUCN, pois as populações têm se mantido relativamente estáveis, tendo sido considerados animais menos suscetíveis às ações de predação humana (GONGORA et al., 2011).

A conscientização da conservação dos Taiassuídeos pode evitar a redução populacional e o desequilíbrio ecológico do habitat destes animais, ou mesmo a extinção da espécie em certas regiões e países (GONELA, 2003).

2.1.4.4 Instalações e Manejo

Em 2004, foram catalogados e implantados no Brasil 842 criadouros de animais silvestres, de acordo com o IBAMA. Destes, 484 foram criadouros comerciais, 279 conservacionistas e 79 de uso científico registrados e autorizados juntos ao IBAMA. Ainda, 83 destes criatórios já possuíam permissão para exportação de animais, produtos e subprodutos (Rede Nacional de Combate ao Tráfico de animais Silvestres - RENCTAS, 2003).

A criação em cativeiro dos catetos e queixadas pode gerar produtos de valor proteico para o consumo humano, com repercussões favoráveis de ordem econômica e social. A criação em cativeiro representa uma alternativa proteica ao consumo humano. Ainda, pode minimizar os efeitos da caça predatória, dispersão dos grupos de animais, bem como o tráfico e extinção das espécies, que poderiam resultar em desequilíbrios ecológicos e o desmatamento para a prática de atividades pecuárias mais tradicionais, como a bovinocultura (MIRANDA et al., 2010). Com efeito, os criatórios regulamentados de animais silvestres podem ser uma alternativa de renda para produtores rurais e comunidades indígenas (SANTOS et al., 2009). No entanto, a criação de espécies silvestres em condições de cativeiro requer estudos de impacto ambiental, viabilidade econômica e riscos de transmissão de patógenos para animais domésticos e humanos.

O couro dos taiassuídeos possui grande valor comercial, principalmente no mercado externo, e é empregado para a confecção de artigos de luxo (SOWLS, 1997).

Os criadouros podem ser desenvolvidos em sistemas extensivos ou semiextensivos. Se forem estabelecidos em áreas nativas, a obtenção de alimentos e água é facilitada. Estes animais possuem grande habilidade de escavar. Portanto, a parte inferior da cerca do criatório deverá ser de blocos de cimento ou tijolos, abaixo do nível do solo, para evitar a fuga dos animais (CUBAS et al., 2006), que pode representar um problema para agricultores e hortifrutigranjeiros da região.

Propõem-se a densidade de um animal para cada 200 a 250m² em sistema semiextensivo de manejo. Queixadas criados em sistema extensivo, obtiveram melhor ganho de peso se comparados a animais em sistema semiextensivo. Este fato pode ser creditado a maior liberdade dos animais para obtenção de alimentos e, provavelmente, por assemelhar-se a criação em vida livre (FIGUEIRA et al., 2003).

Os recintos destas espécies em zoológicos devem seguir a Instrução Normativa nº4 de 4 de março de 2002, do IBAMA. Devem possuir uma área de pelo menos 6,6 m² por animal e seguir todas as normas para garantir a segurança dos espécimes silvestres, do público visitante, dos técnicos e tratadores (BRASIL, 2002).

Em criadouros comerciais essas espécies são mantidas com a finalidade de venda de matrizes, da carne e couro. As matrizes do plantel inicial podem ser originárias de criadouros comerciais ou capturadas na natureza, somente após a autorização do IBAMA, que expedirá licença com base na Portaria nº 118, de 15 de outubro de 1997 (BRASIL, 1997).

2.1.5. Principais doenças de origem infecciosa

Em geral, os taiassuídeos são suscetíveis às mesmas doenças que acometem os suínos domésticos, com destaque especial para a doença de Aujeszky, peste suína clássica, raiva, febre aftosa, brucelose, leptospirose, micobacterioses e toxoplasmose, em razão do impacto em saúde animal e saúde pública. Tanto os animais de vida livre como os de cativeiro são suscetíveis a diferentes patógenos, cuja prevalência varia de acordo com a região geográfica, contato com animais domésticos, manejo e habitat dos animais (CUBAS et al., 2006). No entanto, apesar da linfadenite granulomatosa representar uma das principais doenças que acometem os suídeos (SOBESTIANSKY e BARCELLOS,

2007), são incipientes os estudos voltados a investigação de infecções por micobactérias e *R. equi* em taiassuídeos.

2.2 Rodococose

2.2.1 Propriedades gerais de *R. equi*

R. equi pertence ao grupo dos actinomicetos aeróbicos. São bactérias intracelulares facultativas, de comportamento oportunista. Apresentam-se sob a forma de cocos ou pequenos bacilos gram-positivos, com 1 a 5 micrômetros (μm), catalase-positivos, oxidase-negativos, fracamente ácido-resistentes. São isolados a partir de 48 a 72 horas, sob condições de aerobiose, entre 30 e 37°C, em meios convencionais como o ágar suplementado com sangue ovino (5%) desfibrinado (QUINN et al., 2005, 2011) e meios seletivos como o ágar CAZ-NB (ceftazidima, novobiocina e ciclohexamida) (LARA et al., 2015), que é utilizado para o cultivo de materiais contaminados como fezes, areia e solo. Apresentam colônias tipicamente mucóides, não hemolíticas, inicialmente de cor branco-acinzentada que, com o envelhecimento das culturas, assumem tonalidade salmão (QUINN et al., 2005, 2011).

O micro-organismo está amplamente distribuído no ambiente. *R. equi* é isolado em diferentes tipos de solos, bem como nas fezes e do intestino de animais doentes e sadios (BELL et al., 1998). O micro-organismo é eliminado principalmente pelas fezes de herbívoros e onívoros, incluindo equinos, bovinos, suínos, ovinos, caprinos e cervos. Raramente a bactéria é isolada das fezes de aves, humanos e cães (PRESCOTT, 1991). Recentemente, foi descrito primeiro isolamento de *R. equi* das fezes de gatos, sem sinais entéricos, de ambiente rural no Brasil (PAULA, 2016).

Devido ao habitat predominantemente telúrico, *R. equi* apresenta requerimentos nutricionais simples, facilmente supridos pelas fezes dos animais (principalmente de equinos, bovinos e outros herbívoros), devido à riqueza em ácidos orgânicos voláteis (MEIJER e PRESCOTT, 2004). Apresenta elevada resistência no meio ambiente, mantendo-se viável por até 12 meses em fezes de herbívoros ou no solo, mesmo exposto às variações de temperatura e pH (BENOIT

et al., 2002). Possui, também, relativa resistência a certos produtos químicos como ácido oxálico (2,5%) e ácido sulfúrico (5%), respectivamente, por 60 a 45 minutos (HIRSH e ZEE, 2003).

2.2.2 Virulência

Diferentes fatores de virulência conferem ao *R. equi* mecanismos de evasão do sistema imune, possibilitando a multiplicação do patógeno no interior de fagócitos (neutrófilos e macrófagos), como a presença de cápsula polissacarídica (PRESCOTT, 1991), do ácido micólico, e das enzimas colesterol oxidase e fosfolipase C, que dificultam o mecanismo clássico de resolução de processos inflamatórios do hospedeiro desencadeados contra agentes bacterianos (ZINK et al., 1986; QUINN et al., 2005, 2011).

A parede celular de *R. equi*, composta pelo ácido micólico, apresenta 30-54 unidades de carbono, diferentemente do gênero *Corynebacterium*, composto por 22-38 unidades, e do gênero *Mycobacterium* com 60-90 unidades de carbonos (HIRSH e ZEE, 2003; KREWER et al., 2008). As bactérias que apresentam maior número de cadeias de carbono dificultam a fusão do fagossoma com o lisossoma e, conseqüentemente, a inativação do agente no interior do fagolisossoma (KREWER et al., 2008).

Outro mecanismo de virulência das linhagens de *R. equi* é denominado “fator equi”, que é determinado por exoenzimas (colesterol oxidase e a fosfolipase C), que possuem atividade lítica para células e tecidos do hospedeiro em razão da formação de poros nas membranas (PRESCOTT, 1991; LINDER e BERNHEIMER, 1997). A produção destas exoenzimas pode ser visualizada no teste clássico de “CAMP”, no qual a semeadura perpendicular de linhagem de *R. equi* em meio de ágar-sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado, diante de cepa padrão beta hemolítica de *Staphylococcus aureus*, resulta em hemólise sinérgica na intersecção da semeadura, formando uma figura com aspecto de “ponta de seta”. Este fenômeno ocorre em razão do efeito sinérgico da ação das exoenzimas de *R. equi* (que promovem a destruição das fosfolipases das membranas dos eritrócitos) e a beta hemolisina de *Staphylococcus aureus*, resultando em hemólise. A liberação do íon ferro dos eritrócitos é considerado importante cofator na multiplicação bacteriana

(PRESCOTT, 1991). Entretanto, não está completamente esclarecido o impacto do “fator equi” na patogenicidade do agente, uma vez que podem estar presentes em isolados virulentos ou não (TAKAI et al., 1995a; BERTONE, 2000).

Nas últimas duas décadas, a patogenicidade de *R. equi* isolados de animais domésticos e humanos tem sido atribuída às proteínas associadas à virulência (Vap) codificadas por plasmídios (TAKAI, 1997). Três níveis de virulência eram conhecidos: virulento, de virulência intermediária e avirulento. No entanto, Ocampo-Souza et al. (2007) propôs um novo plasmídio associado à virulência, proveniente de humanos e linfonodos de bovinos com linfadenite, também denominado “tipo bovino”. Apesar da descrição em 2007 por Ocampo-Souza e colaboradores, somente mais recentemente Valero-Rello et al. (2015) denominaram este novo perfil de VapN (“tipo bovino”), reconhecendo como o terceiro tipo de virulência associado a plasmídios de *R. equi*, isolado de humanos e de linfonodos de bovinos, com e sem reações (pio)granulomatosas.

2.2.2.1 Linhagens virulentas (VapA)

As estirpes virulentas (VapA) contém plasmídios de 85–90 kb e possuem genes responsáveis pela expressão de antígenos de 15 a 17 kDa. As linhagens VapA são isoladas predominantemente de potros com pneumonia, linfadenite mesentérica e colite supurativa e, menos frequentemente, de humanos com rodococose (HINES et al., 1997; TAKAI, 1997). São reconhecidos, até o momento, 11 tipos clássicos de plasmídios virulentos (85 kb I – IV; 87 kb I – II e 90 kb I – V) que codificam VapA e que apresentam distribuição geográfica distinta. Os plasmídios 85 kb tipo I e 87 kb tipo I são encontrados na América do Sul, Austrália e Europa, enquanto o 85 kb tipo II é encontrado exclusivamente na França. Nos EUA, particularmente no estado do Texas, foram detectadas linhagens detentoras de plasmídios 85 kb tipo III e IV. Somente no Japão são identificados os plasmídios 87 kb tipo II e 90 kb tipos I a V (TKACHUK–SAAD e PRESCOTT, 1991; TAKAI et al., 1999; TAKAI et al., 2001; MAKRAI et al., 2002; YUYAMA et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005; MEIJER e PRESCOTT, 2004).

No Brasil, Ribeiro et al. (2005) revelaram a presença de estirpes virulentas (VapA) em 41 linhagens isoladas de potros do interior do estado de São Paulo.

Farias et al. (2007) relataram linhagem virulenta de *R. equi* em gato com infecção cutânea. Estudo com 396 linfonodos (retrofaríngeos e mediastínicos), sem sinais de linfadenite, de equinos abatidos na Polônia isolou somente um *R. equi*, no qual foi detectado VapA 85-kb tipo I (WITKOWSKI et al., 2016).

2.2.2.2 Linhagens de virulência intermediária (VapB)

As linhagens de virulência intermediária apresentam plasmídios de 79–100 kb, que contêm genes que expressam antígenos de 20 kDa, denominados VapB, encontrados com maior frequência em humanos vivendo com HIV/Aids, em linfonodos de suínos e javalis (TAKAI et al., 1996; RIBEIRO et al., 2011a; RZEWUSKA et al., 2014) e, recentemente, como causa de pneumonia em javalis no Brasil (VARGAS et al., 2013).

Os plasmídios de virulência intermediária são representados por 29 tipos (designados por números de 1 a 29), predominantemente identificados em linhagens obtidas de suínos e em humanos (TAKAI et al., 1996; 2001; MAKRAI et al., 2005; 2008), com certa distribuição geográfica. Na Europa, particularmente na Hungria e Polônia, foi descrito o predomínio de linhagens VapB do tipo 5 em isolados de linfonodos submandibulares de suínos (MAKRAI et al., 2002; 2005; WITKOWSKI et al., 2016) e de javalis (*Sus scrofa*) (RZEWUSKA et al., 2014). Na América do Sul, mais especificamente no Brasil, estudo com linfonodos de suínos e javalis – com e sem linfadenite – constou maior frequência de VapB tipo 8, além da detecção dos tipos 1 e 29 (LARA et al., 2011). Em contraste, na Ásia, foi observado o predomínio dos tipos 1 e 2 na Tailândia (Takai et al., 2003) e no Japão (SAKAI et al., 2012).

2.2.2.3 Linhagens avirulentas

As estirpes avirulentas de *R. equi* são encontradas no ambiente de criatórios de animais de produção (principalmente de equinos e bovinos), principalmente no solo e nas fezes. São isoladas também da areia de ambientes de entretenimento de humanos (parques e praças) e jardins (TAKAI, 1997). Estas linhagens são conhecidas como “avirulentas”, pois são desprovidas de plasmídios contendo os genes *vapA* e *vapB* (TAKAI et al., 1994; 1995b; 2001; 2004; FERNANDES et al., 2013) e, mais recentemente, de *vapN* (VALERO-RELLO et al., 2015).

No Japão, Takai et al. (1996), investigaram 173 linhagens de *R. equi* isoladas de amostras de areia e solo provenientes de 115 parques e 49 jardins, e não detectaram estirpe virulenta ou de virulência intermediária. No Brasil, estudo conduzido por Fernandes et al. (2013) isolaram 23 estirpes de *R. equi* provenientes de parques e praças (públicas e privadas) de entretenimento humano do interior de São Paulo. Nesse estudo, todas as linhagens apresentaram ausência dos genes *vapA* e *vapB*, e foram classificadas como avirulentas.

Diferentes estudos em todo o mundo, incluindo na Hungria (MAKRAI et al., 2000, 2002), Tailândia (TAKAI et al., 2002, 2003) e Brasil (RIBEIRO et al., 2011b), descreveram *R. equi* consideradas “avirulentas” em pessoas vivendo ou não com HIV/Aids. Aventa-se, atualmente, que parte dessas linhagens possam deter plasmídios VapN, fato que poderia justificar a patogenicidade do micro-organismo nesses pacientes.

2.2.2.4 Linhagens VapN

São estirpes que não apresentam os genes *vapA* e *vapB*, mas que detém gene *vapN* ou “tipo bovino”. Possuem plasmídeos de 120 kb. São isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouros com linfadenite granulomatosa e de humanos imunocomprometidos (OCAMPO-SOUZA et al., 2007; VALERO-RELLO et al., 2015). Em razão da identificação recente de VapN, ainda não está esclarecido o impacto deste novo tipo de plasmídeo associado à virulência do patógeno em humanos (que vivem ou não com HIV/Aids) e em bovinos, tampouco em outras espécies animais, bem como a distribuição geográfica de isolados de *R. equi* detentoras de VapN nos diferentes países. Neste contexto, estudo na Polônia com 234 linfonodos (submaxilares), sem lesões de linfadenite, obtidos de bovinos abatidos foram isolados três *R. equi*, dos quais nenhum apresentou genes *vapA*, *vapB* ou *vapN* (WITKOWSKI et al., 2016). Em contraste, estudo recente no Brasil com 74 pacientes humanos com rodococose (vivendo ou não com HIV/Aids) e 31 isolados de *R. equi* obtidos de linfonodos (com linfadenite) de bovinos abatidos, no interior do estado de São Paulo, detectou VapN em dois pacientes vivendo com HIV/Aids e 13 (41,9%) linfonodos dos bovinos; sugerindo que poderia haver infecção de humanos com

estirpes VapN pela ingestão de carne crua ou *mal cozida, contaminada com o conteúdo dos linfonodos no momento do abate (LARA, 2017, Comunicação pessoal*).

2.2.3 Rodococose em animais domésticos

A rodococose é uma doença infectocontagiosa piogranulomatosa causada por *R. equi* que acomete animais domésticos, silvestres, selvagens e humanos. O micro-organismo está relacionado às diversas manifestações clínicas, usualmente abscedantes, de difícil tratamento (LINDER, 1997). Entre os animais domésticos, os equinos - particularmente os potros - são a espécie-alvo de *R. equi*. Clinicamente, a doença nos equinos se manifesta por infecções pulmonares e, em menor frequência, por distúrbios entéricos e/ou articulares (QUINN et al., 2005, 2011). Nas demais espécies domésticas, além da pneumonia, o micro-organismo causa principalmente lesões abscedantes de pele, enterite, linfadenite e abscessos em órgãos (RIBEIRO e VARGAS, 2016).

R. equi multiplica-se ativamente no ambiente, tendo como exigência condições mínimas de temperatura, pH e umidade obtidas, basicamente, a partir do solo e material fecal de animais. Multiplica-se em extremos de temperatura (15°C a 37°C), mas, preferencialmente, em ambientes quentes, fato que explicaria a elevada ocorrência da doença em países de clima tropical. Diferenças anuais entre as condições ambientais, notadamente de temperatura, poderiam justificar variações sazonais nas infecções pela bactéria em animais domésticos (PRESCOTT, 1991).

2.2.4 Rodococose em suídeos

Nos suídeos a rodococose está praticamente restrita ao trato linfático. Os linfonodos mais comumente acometidos são os submandibulares e da cadeia mesentérica (LARA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011a). Nestes animais,

* LARA, G.H.B. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu). Comunicação Pessoal, 2017.

raramente *R. equi* se dissemina dos linfonodos e atinge outros órgãos (RADOSTITS et al., 2007).

No Japão, 1.832 linfonodos de suínos sem lesões aparentes foram colhidos na linha de abate. Destes, 56 (3,1%) linhagens de *R. equi* foram isoladas, dos quais 54 estirpes continham VapB e duas VapA (TAKAI et al., 1996).

Na Eslovênia, o cultivo microbiológico de 260 linfonodos de suínos identificou linhagens de *R. equi* isoladas em cultura pura (27,3%), em associação com *M. avium* (3,9%) ou com outras micobactérias (1,5%). Entre os isolados de *R. equi*, 60% das linhagens revelaram virulência intermediária enquanto as demais foram classificadas como avirulentas (PATE et al., 2004).

Makrai et al. (2005) realizaram estudo com a virulência de *R. equi* em suínos da Hungria, no qual isolaram 164 linhagens de 1.173 linfonodos submandibulares sem lesões aparentes e, em 44 (26,8%) isolados, foi identificada presença de VapB. No mesmo país, Makrai et al. (2008) avaliaram a virulência de 82 isolados de *R. equi* originários de linfonodos submandibulares de javalis e identificaram que 61 (74,4%) das linhagens eram avirulentas e 21 (25,6%) de virulência intermediária, com predomínio de VapB tipo 5.

No Japão foram identificadas 89 (5,5%) linhagens de *R. equi* virulentas ou de virulência intermediária de um total de 1.615 linfonodos de suínos (Madarame et al., 1998).

Estudo com a virulência de 105 (26,6%) isolados de *R. equi* obtidos de 395 linfonodos submaxilares de suínos, sem lesões aparentes, detectou em 103 estirpes 87,9% VapB tipo 5, em 3,7% tipo 1 e 0,9% outros perfis (tipos 4, 7, 10, 11, 21 e 31) (WITKOWSKI et al., 2016).

No Brasil, Lara et al. (2011) investigou a virulência de 40 linhagens de *R. equi* isoladas de 150 amostras de fezes de suínos provenientes de abatedouros, do interior do estado de São Paulo. Em dois (5,0%) isolados foram detectados plasmídios VapB tipo 8 e os demais identificados como avirulentos. Apesar da emergência da doença, são escassos os estudos no Brasil investigando os mecanismos de virulência de estirpes de *R. equi* isoladas dos animais e humanos.

Em abatedouros no estado de São Paulo foram colhidos 378 linfonodos de suínos e javalis para estudo da virulência, dos quais foram isoladas 23 (6,1%)

linhagens de *R. equi*. Destes, foram identificadas 16 (69,5%) linhagens com virulência intermediária (VapB), com predomínio do tipo 8 (GUAZZELLI et al., 2009). Recentemente, *R. equi* foi descrito causando broncopneumonia em javalis no país (VARGAS et al, 2013). No entanto, na literatura consultada, não foram encontrados estudos conduzidos com o isolamento de *R. equi* de linfonodos de taiassuídeos, com e sem lesões, tampouco que investigasse a virulência dos isolados.

2.2.5 Rodococose humana

A rodococose é considerada nas últimas décadas, em certos países, como doença emergente em humanos (LINDER, 1997; TAKAI, 1997; VERVILLE et al., 1994). As infecções por *R. equi* são descritas, principalmente, em indivíduos severamente comprometidos ou imunossuprimidos, transplantados, portadores de neoplasias, submetidos à terapia prolongada com corticóides e, em especial, pessoas vivendo com HIV/Aids (LINDER, 1997; TAKAI et al., 2002). A Organização Mundial da Saúde (World Health Organization-WHO) estimou que, em 2015, 37 milhões de pessoas estavam vivendo com HIV/Aids (WHO, 2016). No Brasil, o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica registrou que, entre 1980 e 2006, ocorreram 433 mil casos de Aids oficialmente notificados. Até metade da década de 1990, as taxas de incidência atingiram 19 casos da doença/ 100 mil habitantes. Destes, cerca de 80% concentravam-se nas regiões Sudeste e Sul do país (BRASIL, 2007).

Em geral, a transmissão de *R. equi* dos animais para os humanos está relacionada à exposição ao agente no ambiente, secundária à inalação ou por lesões transcutâneas (PRESCOTT, 1991; ADAL et al., 1995). No entanto, evidências recentes suportam que a infecção humana pode ocorrer pelo consumo de carne crua ou sem tratamento térmico adequado de animais de produção (TAKAI et al., 2002), contaminado com o conteúdo dos linfonodos (LARA, 2009; RIBEIRO et al., 2011a) ou pelas fezes (LARA, 2013; LARA et al., 2015) na linha de abate ou em abates clandestinos, indicando, também, risco ocupacional (RIBEIRO e VARGAS, 2016).

Clinicamente, a rodococose manifesta-se nos pacientes como pneumonia cavitária crônica com derrame pleural. São observados também, em menor

frequência, quadros extrapulmonares como abscessos renais, diarreia com sangue, caquexia, pleurisia, hepatopatias, peritonite, artrite séptica, osteomielite, linfadenite e meningite (BROWN, 1995; SEVERO e LONDERO, 1996).

Estudo realizado na Tailândia isolou seis linhagens de *R. equi* em pessoas vivendo com HIV/Aids. Destas seis linhagens, quatro foram caracterizadas como de virulência intermediária (VapB) (TAKAI et al., 2002). Outro estudo similar na Hungria identificou sete linhagens de *R. equi* originárias de pessoas vivendo com HIV/Aids, das quais cinco linhagens foram identificadas como de virulência intermediária (MAKRAI et al., 2002).

No Brasil, Caterino-de-Araújo et al. (2000) notificaram pioneiramente a rodococose em paciente humano vivendo com HIV/Aids, apresentando sinais pulmonares, no qual foi detectado *R. equi* de virulência intermediária. Nos EUA, Verville et al. (1994) investigaram minuciosamente a epidemiologia de 12 casos de rodococose humana. Destes pacientes, seis estavam coinfectedados com o vírus HIV, dois tinham histórico de contato estreito com equinos e seu ambiente de criação, um apresentava contato com cão doméstico e outro com ambiente rural. Curiosamente, nenhum destes pacientes tinha histórico de contato com suínos. Apesar da similaridade entre a virulência de linhagens de *R. equi* isoladas de pessoas vivendo com HIV/Aids e de suídeos (TAKAI et al., 1996), não está completamente esclarecido o papel dos suídeos, tampouco dos taiassuídeos, como fontes de infecção para os humanos e para outros animais domésticos, ou mesmo na contaminação ambiental com linhagens patogênicas.

Em 2011 foi investigada pela primeira vez no Brasil a virulência de 20 estirpes de *R. equi* isoladas de humanos no país. Destes, nove linhagens foram isoladas de pacientes que viviam com HIV/Aids, seis de HIV-negativos e cinco de “status” desconhecido. Foram detectadas cinco linhagens VapB tipo 8 (todas em pessoas vivendo com HIV/Aids), quatro VapA e onze avirulentas. Dentre os 20 indivíduos, onze tinham histórico de contato com ambiente rural e/ou animais de produção (bovinos, equinos). Os autores destacaram o predomínio de linhagens VapB tipo 8 no Brasil em humanos, particularmente em pessoas vivendo com HIV/Aids (RIBEIRO et al., 2011b).

O reconhecimento recente dos antígenos de virulência de *R. equi* e a utilização destes marcadores em estudos de patogenicidade têm permitido

avanços significativos na identificação do perfil de virulência da bactéria, e são imprescindíveis no entendimento da epidemiologia, patogenia, controle e reflexos em Saúde Pública da doença (RIBEIRO et al., 2007). Neste contexto, são necessários estudos de epidemiologia molecular visando esclarecer o impacto dos animais domésticos, silvestres e selvagens (RIBEIRO e VARGAS, 2016), incluindo os taiassuídeos, na transmissão de linhagens patogênicas entre os animais, para o ambiente e para os humanos.

2.3 Micobacterioses

2.3.1 Propriedades gerais das micobactérias

O gênero *Mycobacterium* inclui várias espécies com relevância em saúde animal e saúde pública, que podem ser divididas em três grupos: (1) patógenos obrigatórios para humanos e animais, (2) micobactérias potencialmente patogênicas para humanos e animais, também chamadas oportunistas, atípicas ou “não tuberculosas” e (3) micobactérias saprófitas ou ubíquas (SATANFORD e STANFORD, 2012; PAES e FRANCO, 2016).

Patógenos obrigatórios incluem espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, representados classicamente por *M. tuberculosis* (agente da tuberculose humana), *M. bovis* (agente da tuberculose bovina), *M. africanum*, bacilo de Calmette-Guérin, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, e *M. canetti* (UNE e MORI, 2007; SATANFORD e STANFORD, 2012). Na última década foi proposta a inclusão neste grupo de *M. mungi* (ALEXANDER et al., 2010), *M. orygis* (VAN INGEN et al., 2012) e *M. suricattae* (DIPPENAAR et al., 2015). Micobactérias potencialmente patogênicas, atípicas ou “não tuberculosas” incluem, principalmente, o complexo *M. avium intracellulare* (*M. avium* subespécie *avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. avium* subespécie *hominissuis*, *M. avium* subespécie *silvaticum*, *M. colombiense* e *M. indicus* subespécie *pranii*), *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii* e *M. xenopi* (SOMOSKOVI e SALFINGER, 2014). Micobactérias oportunistas ou saprófitas (ambientais) são encontradas no ambiente e podem ser exemplificadas pelas espécies *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. smegmatis* e *M. phlei* (SATANFORD e STANFORD, 2012).

Bactérias do gênero *Mycobacterium* são bacilos álcool-ácido resistentes, não formadores de esporos, aeróbicos e imóveis (QUINN et al., 2005, 2011). Comumente causam infecções crônicas, induzindo reações granulomatosas clássicas denominadas “tubérculos”, de difícil resolução tecidual (PAES e FRANCO, 2016). As micobactérias são resistentes a muitos desinfetantes e às condições do meio ambiente. A resistência da bactéria é creditada ao alto teor de lipídios da parede celular. São identificadas pela coloração de Ziehl-Neelsen, onde a fucsina carbólica se liga aos lipídios da parede celular e não é removida pelo descorante álcool-ácido, mostrando bacilos de coloração avermelhada (BAAR) ou álcool-ácido resistentes (QUINN et al., 2005, 2011). *M. tuberculosis* e *M. avium* são isoladas em meios especiais - como o Löwenstein-Jensen - constituídos por gema de ovo e amido, enriquecidos com asparagina e contendo verde malaquita para inibir organismos contaminantes. Para isolamento de *M. bovis* utiliza-se meios contendo piruvato, ao invés de glicerol, como Stonebrink-Leslie, posto que o glicerol inibe a multiplicação de *M. bovis* (PAES e FRANCO, 2016).

2.3.2 Micobacterioses em animais domésticos

A infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis* em humanos e bovinos, respectivamente, recebe o nome de tuberculose. Apesar de o bacilo acometer qualquer órgão, as infecções pulmonares são mais comuns nos animais domésticos. No entanto, menos frequentemente, infecções extrapulmonares por micobactérias são descritas no intestino, linfonodos, pele, fígado, sistema nervoso central, ossos e outros órgãos de animais domésticos (PAES e FRANCO, 2016).

2.3.3 Micobacterioses em animais silvestres

As infecções por micobactérias em animais silvestres geralmente estão restritas aos relatos de casos. A título de exemplo, *M. marinum* foi descrito em colônia de rã-touro (FERREIRA et al., 2006), *M. kansasii* em coati (*Nasua nasua*) (ROCHA et al., 2013), *M. bovis* em coati (MURAKAMI et al., 2012) e *M. tuberculosis* em macaco-aranha de cara vermelha (*Ateles paniscus*) (ROCHA et al., 2011).

Em taiassuídeos, o diagnóstico de tuberculose, brucelose e leptospirose foi investigado em 41 catetos originários de vida livre recém-alojados em cativeiro. Todos os animais foram soro negativos para tuberculose, embora dois animais machos foram reagentes para brucelose e quatro para leptospirose, porém sem sinais clínicos da doença. Os autores referiram que estes animais provavelmente foram infectados em seu habitat de origem e ressaltaram a importância da vigilância epidemiológica das principais doenças infecciosas que acometem a espécie, particularmente para micro-organismos de potencial zoonótico (SILVA et al., 2001).

2.3.4 Micobacterioses em suídeos

A espécie suína é suscetível à infecção pelo *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis* e as micobacterias não-tuberculosas, das quais se destacam às pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (CORRÊA e CORRÊA, 1992; PAES e FRANCO, 2016). Ocasionalmente, são descritos também infecções em suídeos por micobactérias saprófitas (LARA et al., 2011).

A linfadenite infecciosa suína por *Mycobacterium* sp. representa afecção de impacto negativo na criação da espécie em todo mundo, causada historicamente por *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Entretanto, com o incremento técnico da suinocultura nas últimas décadas, o isolamento do complexo *Mycobacterium avium* e outras micobactérias atípicas tem superado *M. bovis* e *M. tuberculosis*, principalmente em áreas que os suínos são alimentados com cama de frango (McGAVIN e ZACHARY, 2007).

As lesões por micobactérias em suínos e javalis geralmente estão restritas ao trato linfático, principalmente nos linfonodos submandibulares e mesentéricos e, secundariamente, mediastínicos (SILVA et al., 2000; LARA et al., 2011). Os animais comumente são assintomáticos e as lesões identificadas ao abate pelo Serviço de Inspeção Animal (SILVA et al., 2000).

Os linfonodos apresentam-se hipertrofiados em diferentes graus. Ao corte, na linha de abate, mostram usualmente lesões necrótico-purulentas focais, de diâmetro variável e cor branco-amarelada, contendo ou não secreção caseosa (CORRÊA e CORRÊA, 1992). A presença deste padrão de lesão na linha de abate determina a

condenação parcial ou total da carcaça, dependendo do órgão e extensão das lesões (MARTINS et al., 2001).

No Brasil, 74 isolados de micobactérias atípicas foram identificados dentre 95 micobactérias obtidas de 500 amostras de linfonodos de suínos aparentemente normais (CASTRO et al., 1978).

Lara et al. (2011) identificaram 31 (24,1%) isolados de *Mycobacterium* spp. em 129 amostras de linfonodos de suínos e outros cinco (8,4%) isolados da bactéria em 60 amostras de linfonodos de javalis com lesões piogranulomatosas, em animais destinados ao abate no interior do estado de São Paulo. Neste estudo, tanto em suínos quanto em javalis, com e sem linfadenite, foi observado o predomínio de isolamento de *Mycobacterium avium* tipo 1 e tipo 2. O mesmo grupo de pesquisadores isolou *Mycobacterium diernhoferi* e *Mycobacterium flavescens* das fezes de suínos sem sinais entéricos de abatedouros do interior do estado de São Paulo (LARA, 2013).

O javali é considerado importante reservatório de *M. bovis* e de micobactérias “não tuberculosas” na Espanha, devido à presença do micro-organismo em linfonodos da cadeia respiratória e digestória, mesmo em javalis criados distantes de plantéis de animais domésticos (NARANJO et al., 2008).

Estudo na Itália identificou três linhagens de *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, três *M. avium*, duas *M. scrofulaceum* e uma *M. interjectum* em javalis. Diante deste achado, os autores sugeriram a necessidade de deflagração de programa de controle e monitoramento das infecções por micobactérias em animais selvagens no país (ZANETTI et al., 2008).

Neste contexto, é crescente o número de relatos de infecção por micobactérias em animais silvestres, reconhecendo a importância dessas espécies como reservatórios ou portadores da tuberculose e micobacterioses (ALHAJI, 1969; ROSEMBERGER, 1983; THOEN et al., 1984). Em contraste, é incipiente o número de estudos relacionados às infecções por micobactérias em taiassuídeos criados em cativeiro, ou mesmo de vida livre, com o intuito de abate para o consumo humano, fato que dificulta avaliar o impacto dessas espécies como reservatórios do patógeno para outros animais e humanos. A título de exemplo, países onde existem criações de outras espécies silvestres, como cervídeos, enfrentam grande desafio no controle da tuberculose. Na Nova Zelândia, Dinamarca e Reino Unido a tuberculose em

cervídeos, causada por *M. bovis*, tornou-se doença de impacto econômico e de reflexos em Saúde Pública (CLIFTON-HADLEY e WILESMITH, 1991), exigindo que esses países desenvolvessem programas de controle da doença em cervos (O'REILLY e DABORN, 1995). A preocupação com o controle e erradicação das infecções por micobactérias em animais silvestres e selvagens representa grande desafio para os profissionais de saúde, devido à proximidade cada vez maior entre estas espécies com animais domésticos e humanos, que podem favorecer a transmissão do patógeno.

2.3.5 Micobacterioses e tuberculose em humanos

A tuberculose é considerada doença emergente e altamente preocupante, particularmente para pessoas que vivem com HIV/Aids, em razão da elevada morbimortalidade e pelo aumento da multirresistência do patógeno aos antimicrobianos (HOLLOWAY et al., 2011). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015) estimou que, em 2015, ocorreram cerca de 9,6 milhões de novos casos da doença em humanos, com 1,5 milhões de mortes, e afirmou que a tuberculose foi considerada, pela primeira vez, a principal doença infecciosa em todo o mundo superando, inclusive, os casos de Aids. Os países mais acometidos pela tuberculose humana são os do continente asiático, com predomínio na Índia, China e Indonésia. O continente americano também apresenta altas taxas da doença. No Brasil, cerca de 70.000 novos casos ocorrerem todo ano, resultando em 4.600 mortes.

As infecções por micobactérias em humanos ocorrem principalmente por espécies do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii* e *M. pinnipedii*). Outras espécies também infectam os humanos como as pertencentes às micobactérias atípicas ou “não tuberculosas”, incluindo *M. avium*, *intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. simiae* e *M. nonchromogenicum* (MURRAY et al., 2007). Estas espécies de micobactérias atípicas caracterizam-se por infecções pulmonares e, secundariamente, acometem outros órgãos vitais, notadamente em indivíduos imunossuprimidos (ACHA e SZYFRES, 2003). Nas últimas décadas, casos humanos por micobactérias atípicas ou “não tuberculosas” têm aumentado de modo preocupante, particularmente em infecções pulmonares em pacientes vivendo com HIV/Aids (INDERLIED et al., 1993;

GENTRY, 1996; WAGNER e YOUNG, 2004). Nestes indivíduos, as fontes de infecção das micobactérias são representadas em grande parte pelos animais domésticos, em razão da transmissão pelo consumo de produtos cárneos, leite e derivados (PAES e FRANCO, 2016).

No Brasil, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo isolou micobactérias do complexo MAC em 103 dentre 2.304 humanos vivendo com HIV/Aids, dos quais em 29 pacientes a doença era disseminada. No entanto, em indivíduos saudáveis, a infecção por *M. avium* é rara, ocorrendo em infecções pulmonares em adultos ou linfadenopatias em crianças (COSIVI et al., 1995). Infecções causadas por espécies do complexo *M. avium* em paciente vivendo com HIV/Aids são subestimadas e, provavelmente, são tão preocupantes quanto às infecções humanas causadas por *M. tuberculosis* (RAMOS et al., 2000).

Considerando a crescente demanda de carne de taiassuídeos por restaurantes especializados em carnes exóticas, o aumento de criatórios em cativeiro, a caça de subsistência em determinadas regiões e a escassez de informações sobre os principais patógenos que possam acometer essas espécies silvestres, o presente estudo investigou a ocorrência de *Rhodococcus equi* e de genes associados à virulência (*vapA*, *vapB* e *vapN*), além das principais espécies do gênero *Mycobacterium*, em linhagens isoladas de linfonodos de catetos e queixadas comercializados para consumo humano.

3. HIPÓTESES DE ESTUDO

- ✓ Isolar *R. equi* e espécies atípicas e saprófitas de *Mycobacterium* sp. em virtude de o hábito alimentar dos taiassuídeos e devido à presença desses micro-organismos no ambiente;
- ✓ Dentre os isolados de *R. equi* obtidos dos taiassuídeos sejam caracterizados plasmídios de virulência intermediária (VapB), de modo similar ao observado em suídeos;
- ✓ É possível que ocorra maior isolamento dos micro-organismos dos linfonodos do trato digestório (mesentéricos e submandibulares), que seria reflexo do predomínio da infecção por via oral pelos patógenos.

4. OBJETIVOS

Geral:

- Identificar a presença de espécies de micobactérias e marcadores de virulência de *R. equi* isolados de linfonodos de taiassuídeos provenientes de criadouros comerciais;

Específicos:

- Avaliar a ocorrência das principais espécies de micobactérias nos linfonodos de taiassuídeos;
- Detectar marcadores de virulência plasmidial (VapA, VapB, VapN) nos isolados de *R. equi*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais, colheita de material e universo amostral

Foram coletados linfonodos de 110 tayassuídeos, dos quais 55 catetos (*Tayassu tajacu*) e 55 queixadas (*Tayassu pecari*). De cada animal foi obtida uma amostra de linfonodo submandibular, um mediastínico e um mesentérico, totalizando 330 linfonodos (110 submandibulares, 110 mediastínicos e 110 mesentéricos). As amostras foram provenientes de criatórios legalizados pelo IBAMA, de criadores que fornecem estes animais silvestres para restaurantes. Após a colheita de material, os linfonodos foram imediatamente refrigerados (4-8°C) em caixas isotérmicas contendo gelo, em seguida congelados (-20°C) até o processamento pelas técnicas microbiológicas e moleculares.

O tamanho amostral para investigar a presença de micobactérias e *R. equi* foi calculado com base na população de taiassuídeos disponíveis para amostragem nos cativeiros (população finita) de 1.000 animais, de acordo com os métodos descritos por DOHOO et al. (2010), que resultou na colheita de, no mínimo, 69 animais. Os cálculos foram baseados estimando uma prevalência de 5%, com sensibilidade do teste diagnóstico de 90% e nível de confiança de 95%.

5.2. Cultivo microbiológico para isolamento de *R. equi*

Os linfonodos foram cultivados em meio de CAZ-NB seletivo para *R. equi* e incubados a 37°C, por 48-72 horas (MUSCATELLO et al., 2007; LARA et al., 2015). As amostras foram cultivadas no laboratório de Pesquisa em Bacteriologia do DHVSP da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

A caracterização fenotípica dos isolados de *R. equi* foi baseada nas características morfotintoriais (coloração de Gram), de cultivo e bioquímicas, incluindo a realização de testes da catalase, oxidase e CAMP (QUINN et al., 2005, 2011). Todos os isolados de *R. equi* foram estocados em tubos de vidro contendo meio de Lignières, mantidos em temperatura ambiente (25°C) e enviados aos cuidados do Prof. Dr. Shinji Takai, da Universidade de Kitasato no Japão, para a caracterização de virulência. Os isolados foram encaminhados com as devidas permissões de importação do Ministério da Agricultura, Florestal e da Pesca do

Japão e do Certificado Zoosanitário para exportação de micro-organismos emitido pelo MAPA, Brasil (Anexos 1 e 2).

5.2.1 Caracterização da hemólise sinérgica (“fator equi”)

O teste de Camp foi realizado no laboratório de Pesquisa em Bacteriologia do DHVSP da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. Todos os isolados foram semeados perpendicularmente diante de cepa padrão hemolítica de *Staphylococcus aureus* (ATCC 33.591) (QUINN et al., 2005, 2011), no meio de ágar acrescido de sangue ovino (5%) desfibrinado. Após incubação por 48 horas, em condições de aerobiose a 37°C, as linhagens de *R. equi* que apresentaram sinergismo do efeito de hemólise, caracterizado pela formação em “ponta de seta” no ágar, na intersecção com a estria de *S. aureus*, foram consideradas CAMP-positivas (QUINN et al., 2005, 2011).

5.2.2 Determinação de antígenos e plasmídeos de virulência

5.2.2.1 Extração de DNA dos plasmídios

O DNA dos plasmídios foi extraído pelo método de lise alcalina. O material genético extraído foi analisado por digestão com enzimas de restrição: HindIII, BamHI, EcoRI e EcoT22I visando a determinação do tamanho dos plasmídios, considerando virulentas (VapA) linhagens com 85 a 90kb, de virulência intermediária (VapB) entre 79 e 100 kb (TAKAI et al., 1993), VapN (ou “tipo bovino”) com 120 kb (BIRNBOIM e DOLY, 1979; VALERO-RELLO et al., 2015) e avirulentas com ausência dos perfis anteriores.

5.2.2.2 Reação em cadeia pela polimerase

Para amplificação do material genético foi utilizado 10µl de DNA extraído em 50µl de volume contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,3, a 25°C), 50 mM de KCl, 0,2 mM de desoxinucleotídios trifosfatos, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5U de Taq DNA-polimerase e 1mM de cada primer. As amostras foram submetidas a 30 ciclos de amplificação, seguindo as seguintes condições do binômio tempo/temperatura (ciclos): desnaturação por 90 s a 94°C; anelamento por 1 min. a 55°C, e extensão

por 2 min. a 72°C. A detecção de sequências de genes de antígenos virulentos (15–17 kDa) foi realizada utilizando o primer 1 (5'–GACTCTTCACAAGACGGT–3') e primer 2 (5'–TAGGCGTTGTGCCAGCTA–3'), visando a amplificação de sequência entre 569 e 552 pares de base. Para estirpes de virulência intermediária (20 kDa) foram utilizados o primer 3 (5'–AACGTAGTCGCGGTGAGAA–3') e primer 4 (5'–ACCGAGACTTGAGCGACTA–3'), para amplificação gênica entre 240 e 258 pares de base (TAKAI et al., 1995a,b). Para detecção de estirpes VapN ou “tipo bovino” (26 kDa) foram utilizados os *primer* 5 (5'–AGAGTTCATGCGTGACAACG–3') e *primer* 6 (5'–GTCCACAGGTCACCGTTCTT–3') (VALERO-RELLO et al., 2015).

5.3. Identificação microbiológica de micobactérias

Cerca de um grama de cada linfonodo foi macerado com 5 mL de solução fisiológica em gral esterilizado para o processo de descontaminação de acordo com o método de Petroff (CORRÊA e CORRÊA, 1992), modificado. Para a descontaminação foi adicionado inicialmente hidróxido de sódio (NaOH à 8%). A amostra permaneceu por 30 minutos em estufa a 30°C. O pH foi ajustado com ácido sulfúrico (H₂SO₄ a 8%), com ambas as soluções na concentração de um mol.L⁻¹. O material foi submetido a três centrifugações a 604,8g, descartando o sobrenadante a cada centrifugação (LARA, 2013). Uma alíquota das amostras descontaminadas foi semeada nos meios de Stonebrink–Lesslie e Loewenstein-Jensen, seletivos para micobactérias (QUINN et al., 2005, 2011), em garrafas de plástico transparentes tipo “cultura celular”, esterilizadas, vedadas com tampa de rosca (LARA, 2013).

As amostras cultivadas nos dois meios supracitados foram incubadas em condições de aerobiose, a 37°C, por 90 dias, com acompanhamento semanal do isolamento bacteriano. Os meios foram incubados em posição horizontal, favorecendo o contato do inóculo com toda a superfície do meio, bem como a secagem da fração líquida (LARA, 2013). As colônias com morfologia e características compatíveis com micobactérias foram submetidas à coloração de Ziehl–Neelsen para identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (QUINN et al., 2005, 2011). As colônias BAAR-positivas, compatíveis com o gênero *Mycobacterium*, foram subcultivadas em garrafas de plástico tipo “cultura celular”

nas condições de descritas acima, em ambos os meios de Stonebrink–Lesslie e Loewenstein-Jensen, até o processamento pelas técnicas moleculares de reação em cadeia pela polimerase (PCR) com enzimas de restrição e multiplex-PCR.

5.4 Extração e purificação de DNA

Foi retirada uma alçada da massa bacteriana presente nos meios de cultura Stonebrink–Lesslie e Loewenstein-Jensen, com isolamento de colônias compatíveis com micobactérias, e transferida para um microtubo contendo 400µL de tampão TE (10mM TRIS-HCl e 1mM EDTA com pH 8). O conteúdo do microtubo foi homogeneizado e incubado a 100°C por 5 minutos. Adicionou-se 50µL de lisozima (10mg/mL) seguido da homogeneização e incubação a 37°C “overnight”. Em seguida foi adicionado 5µL de proteinase K (10mg/mL) e 70µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. A amostra foi homogeneizada e incubada a 65°C por 10 minutos. Subsequentemente foi adicionado 100µL de NaCl 5M e 100µL de solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)/NaCl, pré-aquecida, a 65°C seguida de homogeneização e incubação a 65°C por 10 minutos. Foi adicionado 750µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguido de homogeneização e centrifugação a 12.000g por 10 minutos. Foi transferido 450µL do sobrenadante para outro microtubo e adicionou-se 450µL de isopropanol (2-propanol). A amostra foi mantida a temperatura de -20°C por 30 minutos, seguida da centrifugação a 12.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado à amostra 1.000µL de etanol (70%) gelado. Em seguida, a amostra foi submetida à nova centrifugação a 12.000g por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o microtubo foi colocado em um termobloco a 56°C por cerca de 10 minutos com intuito de secar a amostra. O pellet foi ressuspenso em 30µL de tampão TE e armazenado a -20° até a utilização na amplificação.

A extração e a purificação do DNA foi realizada de acordo com os protocolos de VAN SOOLINGEN et al. (1994) e BEMER-MELCHIOR e DRUGEON (1999) adaptados.

5.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Foram realizados diferentes procedimentos de PCR com a finalidade de identificar as espécies de *Mycobacterium*. Inicialmente foi realizado o TB PCR multiplex utilizado para diferenciar espécies pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), complexo *M. avium*, *M. intracellulare* e *Mycobacterium* spp. em uma única reação por meio de *primers* com diferentes alvos e tamanhos de produtos. O RD (região de diferença) PCR multiplex foi utilizado para as bactérias pertencentes ao CMT e a PCR com análise de restrição enzimática (PRA) foi utilizada para as demais micobactérias.

Em todos os procedimentos foram utilizados 1,25U de *Taq* DNA polimerase, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM MgCl₂, 1,25mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato e água ultrapura para um volume final de 25µL.

5.5.1 TB PCR Multiplex

Para a realização do TB PCR multiplex foi utilizado o protocolo descrito por Wilton e Cousins (1992). Foram adicionados 10 pmoles de cada *primer* de acordo com o Quadro 1. Acrescentou-se 2,5µL de amostra do DNA extraído das colônias compatíveis com micobactérias.

QUADRO 1. Tamanho em pares de base dos produtos amplificados, sequência e primers utilizados, e genes alvos para a identificação de micobactérias em linfonodos de taissuídeos pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (TB-PCR). Botucatu, SP, 2016-2017.

Grupos ou espécies de micobactérias	Produtos amplificados (pb)	Sequência	Pares de primers	Gene alvo
<i>Mycobacterium</i> spp.	1030	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3'	MYCGEN-F e MYCGEN-R	16S rRNA
<i>M. intracellulare</i>	1030 e 850	5'ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3' e 5'-CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3'	MYCAV-R e MYCINT-F	16S rRNA
CMT	1030 e 372	5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3' e 5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3'	TB1-F e TB1-R	mpb70
Micobactérias atípicas	1030 e 180	5'ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3' e 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	MYCAV-R e MYCGEN-F	16S rRNA

TB=tuberculose, CMT=Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, PB=pares de bases

A amplificação foi realizada com as seguintes condições do binômio tempo/temperatura: um ciclo a 94°C por 10 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 61°C por 2 min e 72°C por 3 min, e um ciclo final a 72°C por 10 min.

5.5.2 RD PCR Multiplex

O RD PCR multiplex é baseado em regiões genômicas deletadas para identificar bactérias pertencentes ao CMT. Foi utilizado no presente estudo o protocolo descrito por Warren et al. (2006). Três reações foram realizadas com finalidades distintas: A primeira reação, RD1/RD4, identifica *M. bovis*, *M. bovis* BCG e as outras espécies. A segunda reação RD9/RD12, diferencia *M. bovis* e *M. caprae*, *M. tuberculosis* e *M. africanum* subtipo II, e as outras espécies. A terceira reação RD1mic/RD2seal, diferencia *M. microti*, *M. pinnipedii* e as outras espécies. Os primers utilizados em cada reação estão descritos no Quadro 2. Foram adicionados os primers a 50 pmoles e 2 µL da amostra de DNA. Os ciclos programados foram: 95°C por 15 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 62°C por 1 min e 72°C por 1min, e um ciclo final a 72°C por 10 min.

QUADRO 2. Primers utilizados nas reações de RD PCR multiplex para a identificação de micobactérias em linfonodos de taiaçuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.

Reação	Sequência do <i>primer</i>
RD1/RD4	RD1-1 (5'-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3') RD1-2 (5'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-3') RD1-3 (5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3') RD4-1 (5'- ATGTGCGAGCTGAGCGATG-3') RD4-2 (5'-TGTACTATGCTGACCCATGCG-3') RD4-3 (5'-AAAGGAGCACCATCGTCCAC-3')
RD9/RD12	RD9-1 (5'-CAAGTTGCCGTTTCGAGCC-3') RD9-2 (5'-CAATGTTTGTTGCGCTGC-3') RD9-3 (5'-GCTACCCTCGACCAAGTGTT-3') RD12-1 (5'-GGGAGCCCAGCATTACCTC-3') RD12-2 (5'-GTGTTGCGGGAATTACTCGG-3') RD12-3 (5'-AGCAGGAGCGGTTGGATATTC-3').
RD1mic/RD2seal	RD1mic-1 (5'-CGGTTTCGTCGCTGTTCAAAC-3') RD1mic-2 (5'-CGCGTATCGGAGACGTATTTG-3') RD1mic-3 (5'-CAATCAGCCAAGACGAGGTTG-3') RD2seal-1 (5'-TCAGCGGTCTCATAGCATTGC-3') RD2seal-2 (5'-CGGGTTGGGAATGTCAGAAAC-3') RD2seal-3 (5'-GCGGCAAGGTACGTCAGAAC-3')

RD= regiões de diferença

A diferenciação entre as espécies foi baseada no número de pares de base identificados na reação (Quadro 3).

QUADRO 3. Tamanho dos produtos amplificados em pares de base utilizados para a identificação de micobactérias em linfonodos de taiassuídeos pela técnica de RD PCR multiplex. Botucatu, SP, 2016-2017

Espécie	RD1	RD4	RD9	RD12	RD1 ^{mic}	RD2 ^{seal}
<i>M. bovis</i> BCG	196pb	268 pb	108 pb	306 pb	195 pb	296 pb
<i>M. bovis</i>	146 pb	268 pb	108 pb	306 pb	195 pb	296 pb
<i>M. tuberculosis</i>	146 pb	172 pb	235 pb	369 pb	195 pb	296 pb
<i>M. africanum</i> II	146 pb	172 pb	235 pb	369 pb	195 pb	296 pb
<i>M. africanum</i> I	146 pb	172 pb	108 pb	369 pb	195 pb	296/168 pb
<i>M. caprae</i>	146 pb	172 pb	108 pb	306 pb	—	—
<i>M. canettii</i>	146 pb	172 pb	235 pb	—	—	—
<i>M. pinnipedii</i>	146 pb	172 pb	108 pb	369 pb	195 pb	168 pb
<i>M. microti</i>	146 pb	172 pb	108 pb	369 pb	127 pb	296 pb

Fonte: (WARREN et al., 2006; HUARD et al., 2003; HUARD et al., 2006)

RD= regiões de diferença

5.5.3 PCR com análise de restrição enzimática (PRA)

A técnica de reação em cadeia pela polimerase com enzimas de restrição foi utilizada para identificar as espécies das micobactérias “não tuberculosas”, oportunistas ou atípicas. O protocolo utilizado foi o descrito por Telenti et al. (1993). Foram utilizados 2,5 µL do DNA extraído, adicionado de 10 pmoles de cada *primer* Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'). Estes *primers* têm como alvo a proteína de choque térmico 65 (*hsp65*) resultando em um produto de 441 pares de base. Os ciclos utilizados foram: um ciclo a 94°C por 10 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, e um ciclo final a 72°C por 10 min. O fragmento amplificado foi digerido pela enzima *BstEII* (Promega, WI, USA) e *HaeIII*

(Invitrogen™, CA, USA), utilizando as instruções do fabricante. Os perfis encontrados foram analisados com o auxílio da ferramenta de bioinformática de domínio público denominada PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>), desenvolvida por Institutos internacionais em parceria com o Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP).

5.5.4 Eletroforese

Para a eletroforese foi utilizado gel de agarose a 1,5% no produto amplificado e gel entre 3 e 4% para o produto digerido. O ágar foi diluído em tampão TBE 0,5X (1M Tris, 0,9M ácido bórico, 0,01M EDTA). Em seguida adicionou-se o Sybr Safe (1µL para cada 10 mL de agarose) para coloração. Após a corrida eletroforética observaram-se as bandas geradas em transiluminador ultravioleta. Os fragmentos foram comparados aos marcadores de peso molecular de 50 pb e 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™, NY, USA).

5.5.5 Sequenciamento

Foi utilizado “kit” comercial (illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification™) para a purificação do amplicon que foi quantificado pelo Nanodrop™. Em todas as amostras o sequenciamento foi efetuado no sentido forward e reverse, em sequenciador automático ABI Prism 3500 DNA Sequences (Applied Biosystems, CA, USA).

5.5.6 Edição e análise das sequências

Foi utilizado o software Chromas Lite 2.6 para analisar e editar os eletroferogramas das sequências obtidas (forward e reverse). Em seguida as sequências foram alinhadas com o programa BioEdit 7.2.5 para a gerar a sequência consenso de cada amostra utilizando o algoritmo ClustalW.

5.5.7. Análise das sequências, construção da árvore filogenética

As sequências consensos de cada amostra foram utilizadas para comparar com as sequências de nucleotídeos do GenBank a fim de determinar a provável espécie analisada. A árvore filogenética foi construída com base no método de Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987) utilizando o software Mega7. Como raiz interna foram utilizadas sequências de espécies de micobactérias identificadas por PCR pertencentes ao complexo *M. avium*. Foi utilizado como “outgroup” uma sequência de *Corynebacterium bovis* para o gene *rpob* e *Nocardia* sp. para o gene *hsp65*. Todas essas sequências foram obtidas do GeneBank. O modelo de substituição dos nucleotídeos foi calculado com o método de Tamura-Nei (1993). A confiabilidade estatística foi confirmada pelo método Bootstrap com 1.000 réplicas.

5.6 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

O presente projeto foi aprovado pela CEUA da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, (protocolo número 101/2015), pois não fere qualquer preceito ético na condução de estudos com animais.

5.7 Autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA

A autorização para atividades com finalidade científica foi concedida pelo IBAMA, através do sistema SISBIO, de número 48983-2.

5.8 Análise estatística

A associação entre a presença dos diferentes micro-organismos isolados em taiassuídeos foram avaliados utilizando o teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, teste Q de Cochran e método de Wilcoxon utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2015, versão 3.2.3), considerando diferença significativa para valores de $p < 0,05$ (DEAN et al., 1994).

6. RESULTADOS

6.1 *Rhodococcus equi*

6.1.2 Diagnóstico microbiológico

Do total de 330 amostras de linfonodos foram isoladas 36 (10,9%) linhagens de *R. equi*, das quais 6,7% dos linfonodos de queixadas ($n=11/165$) e 15,1% ($n=25/165$) dos catetos. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) para o isolamento de *R. equi* em catetos em relação aos queixadas utilizando o teste Exato de Fisher.

Ao utilizar o teste Q de Cochran nos catetos e queixadas pode-se comparar frequências dependentes. Houve diferença significativa ($p<0,05$) no isolamento de *R. equi* entre os linfonodos dos animais amostrados. O contraste pelo método de Wilcoxon indica que não há diferença significativa ($p>0,05$) quando se compara os linfonodos submandibulares e mediastínicos para o isolamento de *R. equi*. Porém, em relação a comparação dos linfonodos submandibulares com os mesentéricos e mediastínicos com os mesentéricos houve diferença significativa ($p<0,05$).

Entre os 11 isolados de *R. equi* das queixadas, 90,9% ($n=10/11$) foram obtidos de linfonodos mesentéricos e 9,1% ($n=1/11$) de linfonodo mediastínico. Nos 25 isolados de *R. equi* dos catetos, 40,0% ($n=10/25$) foram obtidos de linfonodos mesentéricos, 36,0% ($n=9/25$) de submandibulares e 24,0% ($n=6/25$) de mediastínicos. Foi observada diferença significativa ($p<0,05$) para o isolamento de *R. equi* em linfonodos submandibulares de catetos em relação aos queixadas utilizando o teste Exato de Fisher.

Não houve diferença significativa para o isolamento de *R. equi* em linfonodos mediastínicos ($p>0,05$) utilizando o teste Exato de Fisher e mesentéricos ($p>0,05$) utilizando o teste do Qui Quadrado em relação as duas espécies de taiassuídeos.

Ao utilizar o teste Q de Cochran somente no grupo dos queixadas foi observada diferença significativa ($p<0,05$) no isolamento de *R. equi* entre os linfonodos dos animais amostrados. O contraste pelo método de Wilcoxon indica que não há diferença significativa ($p>0,05$) quando se compara os linfonodos submandibulares e mediastínicos para o isolamento de *R. equi*. Porém, em relação a

comparação dos linfonodos submandibulares com os mesentéricos e mediastínicos com os mesentéricos houve diferença significativa ($p < 0,05$).

Ao utilizar o teste Q de Cochran somente no grupo dos catetos não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) no isolamento de *R. equi* entre os linfonodos dos animais amostrados.

Foi observada maior ocorrência de identificação das linhagens de *R. equi* nas amostras de linfonodos de taiassuídeos colhidas dos catetos.

6.1.3 Proteínas associadas a virulência (Vap)

A caracterização do perfil de virulência plasmidial (VapA, VapB, VapN) nas linhagens de *R. equi* revelou que em nenhum dos isolados foi detectado os genes *vapA*, *vapB* ou *vapN*, considerados avirulentos.

6.2 Micobactérias

6.2.1 Diagnóstico microbiológico

Foi isolado *Mycobacterium* sp. de 3,03% ($n=10/330$) do total de linfonodos. Entre os 10 isolados de micobactérias, 60% ($n=6/10$) dos linfonodos foram de queixadas e 40% ($n=4/10$) de catetos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o isolamento de *Mycobacterium* sp em queixadas em relação aos catetos utilizando o teste Exato de Fisher.

Nas queixadas, todos os isolados foram obtidos de linfonodos submandibulares. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para a maior detecção de *Mycobacterium* sp. nos linfonodos submandibulares dos queixadas se comparado aos catetos utilizando o teste Exato de Fisher.

Nos catetos, todas as linhagens foram isoladas de linfonodos mesentéricos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o isolamento de *Mycobacterium* sp em linfonodos mesentéricos de catetos em relação aos linfonodos mesentéricos de queixadas utilizando o teste Exato de Fisher.

Ao utilizar o teste Q de Cochran nos catetos e queixadas não houve diferença significativa ($p>0,05$) no isolamento de *Mycobacterium* sp entre os linfonodos dos animais amostrados.

Ao utilizar o teste Q de Cochran no grupo dos queixadas e no grupo dos catetos, em separado, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) no isolamento de *Mycobacterium* sp entre os linfonodos dos animais amostrados.

Foi observada maior frequência de identificação de micobactérias nas amostras de taiassuídeos colhidas dos queixadas.

6.3 Isolamento de *R. equi* e Micobactérias

A Tabela 1 sumariza a identificação de *R. equi* e micro-organismos do gênero *Mycobacterium* em linfonodos submandibulares, mediastínicos e mesentéricos de taiassuídeos.

TABELA 1 - Isolamento de *Mycobacterium* spp. e *Rhodococcus equi* em linfonodos submandibulares, mediastínicos e mesentéricos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016 - 2017

Micro-organismos	Linfonodos			Total
	Submandibular	Mediastínico	Mesentérico	
<i>Mycobacterium</i> spp.	6/110 (5,4%)	0/110 (0,0%)	4/110 (3,6%)	10/330 (3,0%)
<i>Rhodococcus equi</i>	9/110 (8,2%)	7/110 (6,3%)	20/110 (18,2%)	36/330 (10,9%)
Total	15/110 (13,6%)	7/110 (6,3%)	24/110 (21,8%)	46/330 (13,9%)

Das 330 amostras de linfonodos coletadas, 13,9% (n=46/330) apresentaram isolamento positivo para *R. equi* e/ou *Mycobacterium* spp. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) para a maior detecção de patógenos nos linfonodos dos queixadas se comparado aos catetos. Do total de amostras, 7,3% (n=24/330) dos linfonodos mesentéricos foram positivos para o isolamento de pelo menos um dos agentes estudados, 4,5% (n=15/330) dos linfonodos submandibulares e 2,1%

(n=7/330) dos mediastínicos. Houve maior ocorrência de isolamento de microorganismos nos linfonodos mesentéricos se comparados com os linfonodos mediastínicos e submandibulares.

Em somente uma amostra de linfonodo mesentérico de cateto foi isolado, simultaneamente, *R. equi* e micobactéria.

6.4 Detecção molecular de micobactérias

6.4.1 PCR-PRA

Foram detectadas 10 espécies do gênero *Mycobacterium* pela técnica de PCR-PRA nos linfonodos de taiassuídeos, com predomínio de *M. avium* tipo 1, *M. kumamotonense* tipo1 e *M. colombiense* tipo 1 (Tabela 2).

TABELA 2 - Caracterização molecular pela técnica de PCR-PRA de espécies do gênero *Mycobacterium* em 10 isolados obtidos de linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.

Espécies de micobactérias	Cateto	Queixada	Total
<i>M. avium</i> tipo 1	1/10 (10,0%)	2/10 (20,0%)	3/10 (30,0%)
<i>M. kumamotonense</i> tipo1	2/10 (20,0%)	1/10 (10,0%)	3/10 (30,0%)
<i>M. colombiense</i> tipo 1	-	3/10 (30,0%)	3/10 (30,0%)
<i>M. intracellulare</i> tipo 3	1/10 (10,0%)	-	1/10 (10,0%)
Total	4/10 (40,0%)	6/10 (60,0%)	10/10 (100,0%)

PCR-PRA = Polymerase Chain Reaction – Pattern Restriction Analysis

A amplificação do gene *hsp65* com padrão de restrição enzimática revelou que a maioria dos isolados foram identificados como micobactérias pertencentes ao complexo *M. avium* (Tabela 3). As espécies de micobactérias identificadas com base no método de PCR-PRA foram: *Mycobacterium avium* tipo 1 (n=3), *M. colombiense* (n=4), *M. intracellulare* (n=1) e *M. kumamotonense* (n=2).

TABELA 3 - Identificação, espécie, tempo de isolamento, tamanho de fragmento amplificado pelas enzimas de restrição e espécies de micobactérias identificadas no cultivo microbiológico e PCR-PRA em linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.

ID	Espécie animal	Tempo de isolamento (dias)	BstEII (pb)	HaeIII (pb)	Espécies de micobactérias
1	Queixada	57	320/115/0	130/110/70	<i>M. kumamotonense</i> tipo1
2	Queixada	63	235/210/0	130/105/0	<i>M. avium</i> tipo 1
3	Queixada	57	235/210/0	130/105/0	<i>M. avium</i> tipo 1
4	Queixada	40	235/210/0	130/105/60	<i>M. colombiense</i> tipo 1
5	Queixada	40	235/210/0	130/105/60	<i>M. colombiense</i> tipo 1
6	Queixada	40	235/210/0	130/105/60	<i>M. colombiense</i> tipo 1
7	Cateto	27	320/115/0	130/110/70	<i>M. colombiense</i> tipo 1
8	Cateto	27	235/210/0	145/130/0	<i>M. intracellulare</i> tipo 3
9	Cateto	40	320/115/0	130/110/70	<i>M. kumamotonense</i> tipo1
10	Cateto	27	235/210/0	130/105/0	<i>M. avium</i> tipo 1

ID = identificação, BstEII e HaeIII = enzimas de restrição, pb = pares de base, M. = *Mycobacterium*, PCR-PRA = Polymerase Chain Reaction – Pattern Restriction Analysis

6.2.2 Sequenciamento

Foram sequenciados os genes *hsp65* (heat shock protein 65) e *rpoB* de todas as 10 amostras isoladas, nas quais foram identificadas espécies com identidade, respectivamente, ≥ 96 e 97% (Tabela 4 e 5) quando comparadas com as espécies de referência do GeneBank. As espécies de micobactérias identificadas com base no sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpoB* foram: *Mycobacterium* spp., *M. sinense*, *M. colombiense*, *M. intracellulare* e/ou *M. kumamotonense* (Tabelas 4 e 5).

TABELA 4 - Espécies de micobactérias identificadas por sequenciamento utilizando o gene *hsp65*, medidas estatísticas de significância, número de acesso e fonte de isolamento da espécie de referência, em isolados obtidos linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.

ID	Espécie animal	E.value	Cobertura	Identidade	Acesso	Espécies de micobactérias	Tipo do isolado
1	Queixada	0.0	99%	98%	CP002329.1	<i>M. sinense</i>	Clínico
2	Queixada	0.0	100%	98%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
3	Queixada	0.0	100%	99%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
4	Queixada	0.0	100%	99%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
5	Queixada	0.0	100%	99%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
6	Queixada	0.0	99%	98%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
7	Cateto	0.0	100%	96%	CP002329.1	<i>M. sinense</i>	Clínico
8	Cateto	0.0	98%	99%	KR856203.1	<i>M. intracellulare</i>	Clínico
9	Cateto	0.0	100%	98%	KF432807.1	<i>M. kumamotonense</i>	Clínico
10	Cateto	0.0	99%	98%	CP003324.1	<i>M. intracellulare</i>	Clínico

TABELA 5 - Espécies de micobactérias identificadas por sequenciamento utilizando o gene *rpoB*, medidas estatísticas de significância, número de acesso e fonte de isolamento da espécie de referência, em isolados obtidos linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.

ID	Espécie animal	E.value	Cobertura	Identidade	Acesso	Espécies de micobactérias	Tipo do isolado
1	Queixada	0.0	96%	97%	CP002329.1	<i>Mycobacterium</i> spp.	Clínico
2	Queixada	0.0	100%	97%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
3	Queixada	0.0	100%	99%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
4	Queixada	0.0	99%	97%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
5	Queixada	0.0	100%	97%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
6	Queixada	0.0	99%	97%	CP020821.1	<i>M. colombiense</i>	Clínico
7	Cateto	0.0	100%	97%	CP002329.1	<i>Mycobacterium</i> spp.	Clínico
8	Cateto	0.0	98%	99%	KR856203.1	<i>M. intracellulare</i>	Clínico
9	Cateto	0.0	100%	98%	KF432807.1	<i>Mycobacterium</i> spp.	Clínico
10	Cateto	0.0	99%	100%	CP003324.1	<i>M. intracellulare</i>	Solo

6.2.2.1 Árvore Filogenética

As árvores filogenéticas (Figuras 3 e 4) resultante dos 10 isolados de micobactérias foram identificadas com base nas sequências do GeneBank e, assim como os resultados da PCR-PRA, na sua grande maioria, correspondem a espécies pertencentes ao complexo *M. avium* (TORTOLI et al., 2013; NGEOW et al., 2015).

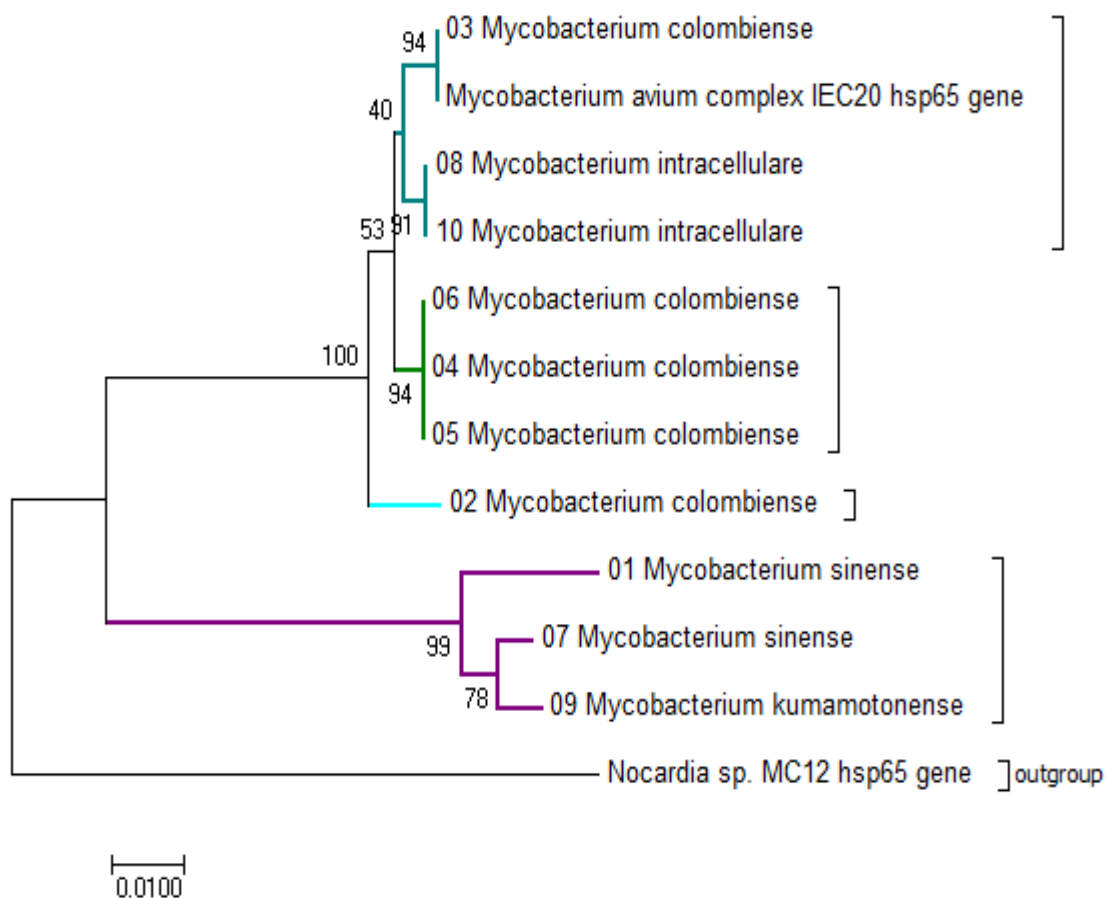


FIGURA 1 - Relação filogenética*, do gene *hsp65*, entre espécies de micobactérias (*M. sinense*, *M. colombiense*, *M. intracellulare* e *M. kumamotonense*) identificadas em linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.

*Árvore filogenética analisada pelo método de Neighbor-Joining, com 1.000 replicações

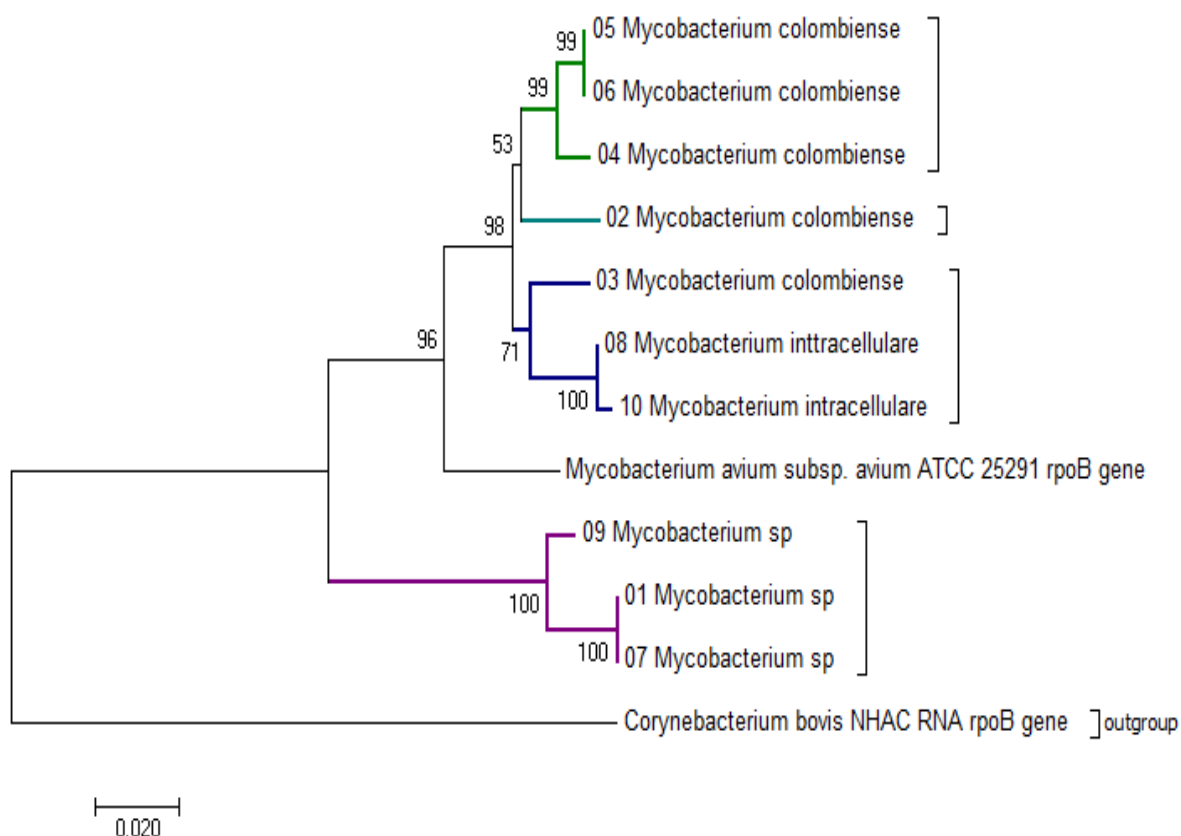


FIGURA 2 - Relação filogenética*, do gene *rpoB*, entre espécies de micobactérias (*Mycobacterium* spp., *M. colombiense*, *M. intracellulare* e *M. kumamotoense*.) identificadas nos linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.

*Árvore filogenética analisada pelo método de Neighbor-Joining, com 1.000 replicações

6.2.2.2 Concordância de detecção das espécies de micobactérias nos testes moleculares

A Tabela 6 mostra a concordância entre a detecção das espécies de micobactérias pelo PCR-PRA e o sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpoB*. Houve concordância de 70% entre as espécies encontradas no sequenciamento utilizando os genes supracitados. Apesar da baixa concordância (somente 40%, para os isolados de número 4, 5, 6 e 8) entre a identificação das espécies de micobactérias no PCR-PRA e sequenciamento, ambas as técnicas detectaram, principalmente, espécies agrupadas no complexo *M. avium*.

TABELA 6 - Comparação das espécies de micobactérias, identificadas por PCR-PRA e sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpob*, em isolados obtidos de linfonodos de taiassuídeos. Botucatu, SP, 2016-2017.

ID	PCR-PRA (espécie)	Sequenciamento gene <i>hsp65</i> (espécie)	Sequenciamento gene <i>rpob</i> (espécie)
1	<i>M. kumamotonense</i> tipo1	<i>M. sinense</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.
2	<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i>
3	<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i>
4	<i>M. colombiense</i> tipo 1	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i>
5	<i>M. colombiense</i> tipo 1	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i>
6	<i>M. colombiense</i> tipo 1	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i>
7	<i>M. colombiense</i> tipo 1	<i>M. sinense</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.
8	<i>M. intracellulare</i> tipo 3	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
9	<i>M. kumamotonense</i> tipo1	<i>M. kumamotonense</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.
10	<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>

ID: identificação, PCR-PRA= PCR com análise de restrição enzimática.

7. DISCUSSÃO

Dentre os 330 linfonodos obtidos de 55 catetos e 55 queixadas amostrados no presente estudo de taiassuídeos de abatedouros legalizados pelo IBAMA, destinados ao consumo humano em restaurantes especializados, foram isolados *R. equi* e *Mycobacterium* spp. em, respectivamente, 10,9% (n=36/330) e 3,03% (n=10/330). Destes, em nenhum dos isolados de *R. equi* foram detectados genes associados a virulência (*vapA*, *vapB* e *vapN*). E, entre as micobactérias, foi encontrado predomínio de linhagens agrupadas no complexo *M. avium*, ou potencialmente patogênicas para humanos e animais (STANFORD e STANFORD, 2012; SOMOSKOVI e SALFINGER, 2014).

Na literatura consultada, a identificação de *R. equi* (submetidos a análise de virulência) e micobactérias em linfonodos de taiassuídeos, destinados ao consumo humano, é descrita pela primeira vez, embora a ausência de estudos similares tenha dificultado confrontar os achados do presente estudo. Ainda, a amostragem do presente estudo foi de conveniência pois, apesar do incremento do consumo humano de carne de taiassuídeos em restaurantes especializados (NOGUEIRA FILHO et al., 2004), ainda é restrito o número de abatedouros legalizados pelo IBAMA que permitem a amostragem destes animais. Neste contexto, apesar do ineditismo do achado, a ausência de estudos similares e a amostragem de conveniência podem ser considerados fatores limitantes do presente estudo.

Ainda que nenhuma das linhagens de *R. equi* tenha sido detectada como virulenta (*VapA*), de virulência intermediária (*VapB*) ou tipo bovino (*VapN*), o isolamento de *R. equi* nos linfonodos de taiassuídeos encontra reflexos em Saúde Pública. Estudos em diferentes países têm referido a rodococose em humanos causada por linhagens avirulentas, incluindo nos EUA (VERVILLE et al., 1994), Japão (TAKAI., 1997) e Tailândia (TAKAI et al., 2002) e Hungria (MAKRAI et al., 2002).

No Brasil, Ribeiro et al. (2011b) identificaram 11 dentre 20 estirpes de *R. equi* isoladas de humanos, classificadas como avirulentas. Nas linhagens desprovidas de plasmídeos contendo os genes *vapA*, *vapB* e *vapN*, a patogenicidade em humanos

poderia ser justificada pela presença de outros fatores de virulência, como a cápsula e as exoenzimas oxidase e fosfolipase C, além da resistência de *R. equi* aos antimicrobianos convencionais, que estariam relacionados a quadros clínicos de doença de difícil tratamento, particularmente em indivíduos com debilidade orgânica ou imunossuprimidos (TAKAI et al., 2003; ACHA e SZYFRES, 2003; RIBEIRO e VARGAS, 2016).

Não foram encontrados na literatura internacional estudos sobre a detecção do perfil de virulência associado aos plasmídeos em isolados de *R. equi* obtidos de linfonodos de taiassuídeos. No entanto, não está completamente esclarecido o papel dos taiassuídeos como fonte de infecção da bactéria para os humanos, para outros animais ou até mesmo na contaminação ambiental com linhagens patogênicas. Com o advento das técnicas moleculares que possibilitaram a identificação das Vaps, estudos em vários países têm contribuído na investigação da virulência/patogenicidade, na epidemiologia molecular (com ênfase a distribuição geográfica dos tipos) e nos riscos dos animais de produção, de companhia, silvestres e selvagens como fontes de infecção do patógeno para os humanos (TAKAI, 1997; MEIJER e PRESCOTT, 2004; RIBEIRO e VARGAS, 2016).

Apesar da similaridade do perfil de virulência - associado a presença de plasmídeos - observado em todo o mundo, entre *R. equi* obtidos de suídeos e humanos (vivendo ou não com HIV/Aids), com predomínio de isolados de virulência intermediária (TAKAI et al., 1996; TAKAI, 1997; MAKRAI et al., 2002), a grande maioria dos pacientes não tem histórico de contato com suídeos, tampouco com os criatórios (TAKAI et al., 2003; LARA et al., 2015). Tal fato suscitou a hipótese de que a infecção de humanos (vivendo ou não com HIV/Aids) com linhagens VapB de *R. equi* de origem suína ou de javalis, poderia ser justificada, em parte, pelo consumo de carne crua ou malpassada, contaminada com o patógeno presente nos linfonodos ou nas fezes, mesmo em animais abatidos com fiscalização (TAKAI et al., 2003; RIBEIRO et al., 2011a; LARA et al., 2015) e, principalmente, sem fiscalização oficial (LARA et al., 2009; LARA, 2013); e se constituiu na principal motivação, por analogia, para o desenvolvimento do presente estudo com linfonodos de taiassuídeos.

Em suínos tem-se confirmado o predomínio de isolamento de *Mycobacterium* sp. em linfonodos submandibulares e mesentéricos de animais destinados ao abate (LARA et al., 2011). De maneira similar, no presente estudo foram identificadas 10 linhagens de micobactérias nos taiassuídeos, das quais 6 provenientes de linfonodos submandibulares e 4 de linfonodos mesentéricos. Tal achado pode estar relacionado à transmissão das micobactérias principalmente pela via oral, em virtude da ampla distribuição destes micro-organismos no ambiente, contaminando o solo, a água, os alimentos e os utensílios dos animais (MURRAY et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007; SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007; QUINN et al., 2011).

A maioria das espécies de micobactérias identificadas neste estudo pertencem ao complexo *M. avium*. Em todo o mundo as espécies de micobactérias pertencentes ao complexo *M. avium* (MAC) têm sido crescentemente descritas nas micobacterioses em humanos, causando comumente infecções pulmonares e, menos frequentemente, extrapulmonares, principalmente em humanos vivendo com HIV-Aids (ACHA e SZYFRES, 2003). Nos pacientes que apresentaram micobacteriose clínica, infectados com o complexo MAC, em 90 a 95% o agente causal foi *M. avium* tipo 1, causando graves problemas respiratórios (KIEHN et al. 1985; SLUTSKY et al. 1994; LEÃO et al. 1999). Nos EUA, foi referido que as micobactérias pertencentes ao complexo MAC representam a principal causa da tuberculose em humanos vivendo com HIV/Aids (INDERLIED et al. 1993).

No Brasil, foram isoladas micobactérias do complexo MAC em 103 pacientes, dentre 2.304 indivíduos vivendo com HIV/Aids (HADAD et al. 1995). Ramos et al. (2000) advertiram que as infecções causadas por espécies do complexo *M. avium* em pacientes vivendo com HIV/Aids são mais comuns do que se tem oficialmente registrado, e são tão graves quanto às infecções humanas causadas por *M. tuberculosis*.

O sequenciamento do gene *hsp65* e *rpoB* dos 10 isolados revelou concordância de 70% e identidade $\geq 96\%$ quando comparadas às espécies similares depositadas no GeneBank, identificando as espécies *M. colombiense*, *M. intracellulare*, *M. kumamotoense*, *M. sinense* e *Mycobacterium* spp. Apesar da baixa concordância (40%) entre as espécies detectadas no PCR-PRA e

sequenciamento dos genes-alvos do estudo, a árvore filogenética elaborada mostrou quatro clusters nos dois genes sequenciados e identificou, predominantemente, micobactérias pertencentes ao MAC (*M. intracellulare* e *M. colombiense*) e, menos frequentemente, micobactérias saprófitas (*M. kumamotonense* e *M. sinense*), das quais, em sua maioria, têm sido descritas em humanos com problemas pulmonares e extrapulmonares, em pacientes com ou sem imunossupressão (MURCIA et al., 2006; JARZEMBOWSKI et al., 2008; ACHA e SZYFRES, 2003; TORTOLI et al., 2013).

A discrepância entre os resultados da PCR-PRA e sequenciamento pode ser atribuída às alterações pontuais nas sequências de nucleotídeos (deleções, inserções, transições). Tal alteração pontual nas sequências interfere com a ação das enzimas de restrição, gerando variação nos fragmentos resultantes, dificultando a comparação com os padrões existentes no site de referência do PRA (RINGUET et al., 1999). Apesar da discrepância de resultados entre os testes moleculares, o sequenciamento tem auxiliado na classificação e reclassificação taxonômica das espécies do gênero *Mycobacterium*, bem como na identificação de novas espécies, ampliando as possibilidades de estudo da diversidade de micobactérias de origem animal, humana e do ambiente (TORTOLI et al., 2013).

Mycobacterium colombiense é uma espécie pertencente ao MAC. Na Colômbia, tem sido descrita causando graves problemas respiratórios e infecções disseminadas em humanos vivendo com HIV/Aids (MURCIA et a., 2006). *Mycobacterium intracellulare* também pertence ao MAC. Essa micobactéria tem sido relatada em pacientes imunossuprimidos (em tratamento de quimioterapia, leucemia) e humanos vivendo com HIV/Aids. Nesses pacientes, as micobactérias do complexo MAC estão associadas com osteomielite, tenossinovite e sinovite, bem como doença disseminada envolvendo o sistema nervoso central (SNC), fígado, baço e medula óssea (ACHA e SZYFRES, 2003).

Mycobacterium kumamotonense e *Mycobacterium sinense* são micobactérias saprófitas podendo serem encontradas comumente no ambiente. Já foram relatadas em pacientes imunossuprimidos causando problemas respiratórios (JARZEMBOWSKI et al., 2008).

Posto que as micobactérias e *R. equi* são micro-organismos amplamente distribuídos no ambiente (PAES e FRANCO, 2016; RIBEIRO e VARGAS, 2016), não existem, até o momento, medidas específicas indicadas para o controle e a profilaxia destes patógenos em taiassuídeos. O aumento do número de criatórios de taiassuídeos em regime de cativeiro, o incremento do consumo de carne dessas espécies em restaurantes especializados (NOGUEIRA FILHO, 2004) e o consumo devido à caça de subsistência em certas regiões (FUCCIO et al., 2003), aliado ao aumento da identificação de *R. equi* e micobactérias “não tuberculosas” ou atípicas em humanos, com e sem imunossupressão; reforçam a preocupação dos achados do presente estudo no contexto de Saúde Pública, bem como a necessidade de estudos de vigilância epidemiológica, em abatedouros, dos principais patógenos que acometem os taiassuídeos, particularmente de potencial zoonótico como *R. equi* e micobactérias.

8. CONCLUSÕES

✓ O isolamento de *R. equi* e/ou espécies de micobactérias em 13,9% (n=46/330) do total de amostras dos linfonodos de taiassuídeos é descrito pela primeira vez na literatura.

✓ O predomínio de isolamento de *R. equi* e micobactérias nos linfonodos do trato digestório (submandibulares e mesentéricos) provavelmente encontra reflexo da infecção principalmente por via oral dos animais, posto que estes patógenos estão presentes no ambiente dos criatórios;

✓ Apesar da ausência de detecção de genes associados a virulência de *R. equi* (*vapA*, *VapB* e *vapM*), a identificação de isolados avirulentos em cerca de 10% dos linfonodos amostrados também denota preocupação no contexto de Saúde Pública, posto que estirpes avirulentas têm sido identificadas em pacientes humanos com rodococose, com ou sem imunossupressão;

✓ A detecção de *M. intracellulare*, *M. colombiense*, *M. kumamotonense* e *M. sinense* nos linfonodos dos animais alerta para os riscos de o consumo humano de carne e derivados destes animais silvestres, posto que as micobactérias atípicas ou “não tuberculosas” e, eventualmente, saprófitas, têm sido crescentemente descritas em infecções em pacientes com e sem imunossupressão;

9. REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Bacteriosis y Micosis. Washington. Organizacion Panamericana de la Salud. 3.ed. v. 1 p.266–283, 2003.
- ADAL, K.A.; SHINER, P.T.; FRANCIS, J.B. Primary subcutaneous abscess caused by *Rhodococcus equi*. **Annals of Internal Medicine**, v. 122, p. 317, 1995.
- ALEXANDER, K.A.; LAVER, P.N.; MICHAEL, A.L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P.D.; WARREN, R.M.; GEY VAN PITTIUS, N.C. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 1296-1299, 2010.
- ALHAJI, I. Bovine tuberculosis: a general review with special reference to Nigeria. **Veterinary Bulletin**, v. 46, p. 829-837, 1969.
- BELL, K.S.; PHILP J.C.; AW, D.W.J.; CHRISTOFI, N. The genus *Rhodococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n.2, p. 195-210, 1998.
- BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2350-2351, 1999.
- BENOIT, S.; BENACHOUÉ, A.; TAOUJI, S.; AUFRAY, Y.; HARTKE, A. H₂O₂, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3768–3776, 2002.
- BERTONE, J.J. Pneumonia e outros distúrbios associados ao *Rhodococcus equi*. *In*: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.830–839, 2000.
- BIRNBOIM, T.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513–1523, 1979.
- BODMER, R.E. Integrating hunting and protect areas in the Amazon. *In*: DUNSTONE, N.; ENTWISTLE, A. (Ed). **Future priorities for the conservation of mammals: has the panda had its day?** Cambridge University Press, 2000.
- BODMER, R.E.; AQUINO, R.; PUERTAS, P.; REYES, C.; FANG, T.Y.; GOTTDENKER, N. **Manejo y uso sustentable de peccaries en la Amazonía peruana**. Quito: Secretaría CITES. p.102, 1997.

- BODMER R.E.; SOWLS L.K. The Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan; 1993. Disponível em: <<http://www.iucn.org/themes/ssc/sgs/pphsg/APchap2-2.htm>>. Acesso em: 16/10/2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Dados e Pesquisas em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 2007. Disponível em: <www.aids.gov.br/> Acesso em: 10/09/ 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1997. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/>>. Acesso em: 23/10/2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2002. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/>> Acesso em: 23/10/2016.
- BROWN, A.E. Other *Corynebacteria* and *Rhodococcus*. In: MANDELL, G.L; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 4.ed. New York: Livingstone, p.1872–1877. 1995.
- CASTRO, A.F.P.; CAMPEDELLI FILHO, O.; WAISBICH, E. Opportunist mycobacteria isolated from the mesenteric lymph nodes of apparently healthy pigs in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. **9**, p. 74-83, 1978.
- CATERINO-DE-ARAÚJO, A.; DE LOS SANTOS-FORTUNA, E.; ZANDONA-MELEIRO, M.C.; CALORE, E.E.; PEREZ CALORE, N.M. Detection of the 20-kDa virulence-associated antigen of *Rhodococcus equi* in malakoplakia lesion in pleural tissue obtained from an AIDS patient. **Pathology Research Practice**, v. 196, n. 5, p. 321-327, 2000.
- CLIFTON-HADLEY, R. S.; WILESMITH, J. W. Tuberculosis in deer: a review. **The Veterinary Record**, v. 129, p. 5-12. 1991.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M.; **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2.ed. Edt. Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p. 317-335, 1992.
- COSIVI, O.; MESLIN, F.X.; DABORN, C.J.; GRANGE, J.M. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa. **Revue Scientifique et Technique**., v.14, n.3, p. 733-746, 1995.

- CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: ROCA; 2006.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COLUMBIER, D. et al. Epi Info Version 6. **A Word Processing, Database and Statistical Program for Epidemiology on Microcomputers**. Atlanta: CDC, 1994. 601p.
- DEUTSCH, L.A.; PUGLIA, L.R. **Os animais silvestres – Proteção, doenças e manejo**. São Paulo: Globo; 1990.
- DIPPENAAR, A.; PARSONS, S.D.C.; SAMPSON, S.L.; VAN DER MERWE, R.G.; DREWE, J.A.; ABDALLAH, A.M.; SIAME, K.K.; VAN PITTIUS, N.C.G.; VAN HELDEN, P.D.; PAIN, A.; WARREN, R.M. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. **Tuberculosis**, v. 95, p. 682-688, 2015.
- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary Epidemiologic Research**. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. 2010.
- FARIAS, M.R.; TAKAI, S.; RIBEIRO, M.G.; FABRIS, V.E.; FRANCO, S.R.V.S. Cutaneous pyogranuloma in a cat caused by virulent *Rhodococcus equi* containing an 87-kb type I plasmid. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 1-2, p. 29-31, 2007.
- FERNANDES, M.C.; RIBEIRO, M.G.; TAKAI, S.; LEITE, D.S.; PINTO, J.P.A.N.; BRANDÃO, P.E.; SANTARÉM, V.A.; LISTONI, F.J.P.; SILVA, A.V. Identification of pathogens and virulence profile of *Rhodococcus equi* and *Escherichia coli* strains obtained from sand of parks. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, p. 23-25, 2013.
- FERREIRA – NETO, J. S.; OLIVEIRA, E. M. D. Linfadenite Granulomatosa dos suínos. *In*: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia**. 2016. p. 399-403.
- FERREIRA, R.; FONSECA, L.D.E.S.; AFONSO, A.M.; DA SILVA, M.G.; SAAD, M.H.; LILENBAUM, W. A report of mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **The Veterinary Journal**, London, v. 171, n. 1, p. 177-180, 2006.
- FIGUEIRA, M.L.O.A.; CARRER C.R.O.; NETO PBS. Ganho de peso e evolução do rebanho de queixadas selvagens em sistemas de criação semiextensivo e

- extensivo, em reserva de cerrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 191-199, 2003.
- FRAGOSO, J.M.V. A long-term study of white-lipped pecacary (*Tayassu pecari*) population fluctuations in northern Amazonia. Anthropogenic vs. "natural" causes. *In*: SILVIUS, KM, BODMER RE, FRAGOSO JMV. **People in nature: wildlife conservation in south and central America**. New York: Columbia University Press, p286-296, 2004.
- FUCCIO, H.; CARVALHO, E.F.; VARGAS, G. Perfil de caça e dos caçadores no estado do Acre, Brasil. **Revista Aportes Andinos**, Quito, n.6, 2003. Disponível em:<<http://www.uasb.edu.ec/padh/centro/pdf56/Heloisa%20FUCCIO.PDF>> Acesso em: 11/10/2016.
- GENTRY, C.A. Atypical mycobacteria. **Seminars in Respiratory Infectious Journal**. v.11, p. 231-43. 1996.
- GONELA, A. Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa domestica* na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp. (porco-Monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada) [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2003.
- GONGORA, J.; CHEN, Y.; BERNAL, J.E.; NICHOLAS, F.W.; MORAN, C. Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. **Animal Genetics**. v. 33, p. 312-327. 2002.
- GONGORA, J.; REYNA-HURTADO, R.; BECK, H.; TABER, A.; ALTRICHTER, M.; KEUROGHLIAN, A. *Pecari tajacu*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T41777A10562361.en>>. Acesso em: 11/10/2016.
- GUAZZELLI, A. Virulência de linhagens de *Rhodococcus equi* isolados de linfonodos de suínos e javalis de abatedouro. (dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2009.
- HADAD, D.J.; PALHARES, M.C.; PLACCO, A.L.; DOMINGUES, C.S.; CASTELO FILHO, A.; FERRAZOLI, L.; UEKI, S.Y.; TELLES, M.A.; MARTINS, M.C.; PALACI, M. Mycobacterium avium complex (MAC) isolated from AIDS patients and the criteria required for its implication in disease. **Revista Instituto de Medicina Tropical**. S. Paulo [online]. 1995, vol.37, n.5, pp. 375-383. ISSN 0036-4665

- HINES, S.A.; KANALY, S.T.; BYRNE, B.A.; PALMER, G.H. Immunity to *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 177-185, 1997.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.119-126, 2003.
- HOLLOWAY, K.L.; HENNEBERG, R.J.; BARROS LOPES, M.; HENNEBERG, A.M. Evolution of human tuberculosis: a systematic review and meta-analysis of paleopathological evidence HOMO. **Journal of Comparative Human Biology** v.62, p.402-458, 2011.
- HUARD, R.C.; FABRE, M.; HAAS, P.; LAZZARINI, L.C.O.; VAN SOOLINGEN, D.; COUSINS, D.; HO, J.L. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 12, p. 4271-4287, 2006.
- HUARD, R.C.; LAZZARINI, L.C.O.; BUTLER, W.R.; VAN SOOLINGEN, D.; HO, J.L. PCR-Based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1637-1650, 2003.
- INDERLIED, C.B.; KEMPER, C.A.; BERMUDEZ, L.E. The *Mycobacterium avium* complex. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n.3, p.266-310, 1993.
- JARZEMBOWSKI, J.A.; MICHAEL, B.; YOUNG, M.D. Nontuberculous mycobacterial infections. **Arch Pathol Lab Med**, 132:1333–1341, 2008.
- KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ A.; REYNA-HURTADO, R.; ALTRICHTER, M.; BECK, H.; TABER, A. *Tayassu pecari*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2013 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20131.RLTS.T41778A44051115.en>> . Acesso em: 11/10/2016.
- KEUROGHLIAN, A.; EATON, D.P.; LONGLAND, W.S. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. **Biological Conservation Science**. v. 2, p. 159-172, 2009.
- KIEHN, T.E.; EDWARDS, F.F.; BRANNON, P.; TSANG, A.Y.; MAIO, M.; GOLD, J.W.; WHIMBEY, E.; WONG, B.; MCCLATCHY, J.K.; ARMSTRONG, D. Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n.2, p. 168, 1985.

- KREWER, C.C.; COSTA, M.M.; SCHRANK, I.; VARGAS, A.C. *Rhodococcus equi*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.4, p.533-545, 2008.
- LARA, G.H.B. Ocorrência e identificação molecular de espécies do gênero *Mycobacterium* e marcadores de virulência em linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos e das fezes de suínos de abatedouro. (tese). Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-UNESP. 2013.
- LARA, G.H.B.; RIBEIRO, M.G.; GUAZZELLI A.; FERNANDES, M.C. Linfadenite infecciosa em suínos: Etiologia, epidemiologia e aspectos em Saúde Pública. **Arquivos do Instituto Biológico** v. 76, p. 317-325, 2009.
- LARA, G.H.B.; RIBEIRO M.G.; LEITE, C.Q.F.; PAES, A.C.; GUAZZELLIA, A.; SILVAC, A.V.; SANTOS, A.C.B. ; LISTONI, F.J.P. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 185-188, 2011.
- LARA, G.H.B.; TAKAI, S.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; LISTONI, F.J.P.; RISSETI, R.M.; DE MORAIS, A.B.C.; RIBEIRO, M.G. VapB type 8 plasmids in *Rhodococcus equi* isolated from the small intestine of pigs and comparison of selective culture media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, p. 306-310, 2015.
- LEÃO, S.C.; BRIONES, M.; SIRCILLI, M.P.; BALIAN, S.C.; MORÉS, N.; FERREIRA NETO, J.S. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants by PCR-restriction enzyme analysis (PRA) in pig and human isolates from Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2592-2597, 1999.
- LINDER, R.; BERNHEIMER, A.W. Oxidation of macrophage membrane cholesterol by intracellular *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v.56, n.3/4, p.269-276, 1997.
- MADARAME, H.; YAEGASHI, R.; FUKUNGA, N.; MATSUKUMA, M.; MUTOH, K.; MORISAWA, N.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; HASEGAWA, Y.; TAKAI, S. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* strains possessing virulence-associated 15 to 17 kDa antigens: experimental and natural cases in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v.119, n. 4, p. 397-405, 1998.
- MAKRAI, L.; FODOR, L.; CSIVINCSIK, A.; VARGA, J.; SENONER, Z.; SZABÓ, B. MAKRAI, L.; FODOR, L.; CSIVINCSIK, A. Characterization of *R. equi* strains

- isolated from foals and from immunocompromised human patients. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 48, n. 3, p. 253–259, 2000.
- MAKRAI, L.; KOBAYASHI, A.; MATSUOKA, M.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; DE´NES, B.; HAJTO, I.; REVESZ, I.; JANOSI, K.; FODOR, L.; VARGA, J.; TAKAI, S. Isolation and characterisation of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 318–323, 2008.
- MAKRAI, L.; TAKAIMA, S.; DÉNES, B.; HAJTÓS, I.; KAKUDA, Y.; TSUBAKI, S.; MAJOR, A.; FODOR, L.; VARGA, J. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1246–1250, 2005.
- MAKRAI, L.; TAKAI, S.; TAMURA, M. Characterization of virulence plasmids in *R. equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. **Veterinary Microbiology**, v.88, n.4, p.377–384, 2002.
- MARTINS, L.S. Epidemiologia e controle das micobacterioses em suínos no sul do Brasil: estimativa do impacto econômico e estudo da sazonalidade. (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2001.
- MAYER, J.J.; WETZEL, R.M. *Tayassu pecari*. **Mammalian Species**. p. 293:1-7, 1987.
- McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4.ed. St. Lows: Prosby Elsevier, p.1476, 2007.
- MEIJER, W.G.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. **Veterinary Research**, v.35. p.383-396, 2004.
- MIRANDA, R.J.S.; DIAS, R.S.; GOMES, A.P.; ROSSI, G.F. A viabilidade econômica da criação de caaitus (*Tayassu tajacu*): um estudo de caso. In: **48º Congresso da Sociedade Brasileira de economia, administração e sociologia rural**; 2010. Campo Grande. Campo Grande: SOBER; 2010.
- MURAKAMI, P.S.; MONEGO, F.; HO, J.L.; GIBSON, A.; VILAN, R.G.; SORESINI, G.C.; BROCKELT, S.R.; BIESDORF, S.M.; FUVERKI, R.B.N.; NAKATANI, S.M.; RIEDIGER, I.N.; GRAZZIOTIN, A.L.; DO SANTOS, A.P.; DE BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W. An outbreak of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in coatis (*Nasua nasua*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.43, n.2, p.338-341, 2012.

- MURCIA, M.I.; TORTOLI, E.; MENENDEZ, M.C.; PALENQUE, E.; GARCIA, M.J. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2049–p.2054, 2006.
- MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; ANDRY, N.L.; PFALLER, M.A. **Manual of clinical microbiology**. 9.ed. Washington: AFM Press, 2007. 1267p.
- MUSCATELLO, G.; GILKERSON, J.R.; BROWNING, G.G. Comparison of two selective media for the recovery, isolation, enumeration and differentiation of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 324–329, 2007.
- NARANJO, V.; GORTAZAR, C.J.; DE LA FUENTE, J. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 1-9, 2008.
- NGEOW, Y.F.; WONG, Y.L.; TAN, J.L.; HONG, K.; NG, H.F.; ONG, B.L.; CHAN, K.G. Identification of new genomospecies in the *Mycobacterium terrae* complex. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1-16, 2015.
- NOGUEIRA FILHO, S.L.G.; ARGÔLO, G.R.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S.S.C. Análise do consumo de carne de animais silvestres no sul da Bahia, Brasil. *In*: Congresso internacional sobre manejo de fauna silvestre em la amazônia y latinoamerica, 2004, Iquitos. WCS, DICE, UNAP, p. 97, 2004.
- OCAMPO-SOUSA, A.A.; LEWIS, D.A.; NAVAS, J.; QUIGLEY, F.; CALLEJO, R.; SCORTTI, M.; LEADON, D.P.; FOGARTY, U.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on *traA*, *vapA*, and *vapB* virulence plasmid markers. **The Journal of Infectious Diseases**, v.196, p.763-769, 2007.
- ODA, S.H.I.; BRESSAN, M.C.; MIGUEL, G.Z.; VIEIRA, J. O.; FARIA, P.B.; SAVIAN, T.V.; KABEYA, D.M. Efeito do método de abate e do sexo sobre a qualidade da Carne de Capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v.24, n.2, p.236-242, 2004.
- OLIVEIRA, R.B.; MELO, J.B. de **O caititu**. Santarém: IARA/IBAMA – GOTAZ/GTZ, 1999 (IARA em Quadrinhos, 8).

- O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76 (Supplement 1), p. 1-46, 1995.
- PAES, A.C.; FRANCO, M.M.J. Tuberculose em animais de produção. *In*: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia**. 2016. p. 512-542.
- PATE, M.; ZDOVC, I.; PIRS, T.; KRT, B.; OCEPEK, M. Isolation and characterisation of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of swine lymph nodes in Slovenia. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.52, n.2, p.143-150, 2004.
- PAULA, C.L. Patógenos bacterianos isolados de fezes de felinos domésticos, sem sinais entéricos, de ambiente rural e urbano. (dissertação). Botucatu: Universidade Estadual Paulista, p.71, 2016.
- PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 20–34, 1991.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1.ed., Edt. Artmed, Porto Alegre, p. 106- 114, 2005.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2.ed. UK: Wiley-Blackwell, p.290-299, 2011.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and Goats**. 9.ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, p.800-804, 2007.
- RAMOS, M.C.; MORAES, M.J.; CALISNI, A.L.; ROSCANI, G.N.; PICOLLI, E.A. A retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**., v.4, p.86-90, 2000.
- RENTAS - **Rede Nacional de Combate ao Tráfico de animais Silvestres**. Animais silvestres: Vida à Venda. Brasília: Dupligráfica; 2003.
- RIBEIRO M.G.; LARA, G.H.B.; TAKAI, S.; GUAZZELLIA, A.; SILVAC, A. V. ; FERNANDES, M.C.; CONDAS, L.A.Z ; SIQUEIRA, A.K. ; SALERNO, T. Virulence

- genes and plasmid profile in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. **Research in Veterinary Science**. v. 91, p. 478-481, 2011a.
- RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; FERNANDES, M.C. Fatores de virulência de *Rhodococcus equi*. Implicações na epidemiologia e controle da rodococose nos animais e no homem. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.2, p.147–163, 2007.
- RIBEIRO, M.G.; SEKI, I.; YASUOKA, K.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85–kb type I, 87–kb type I, and a new variant, 87–kb type III. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p.53–61, 2005.
- RIBEIRO, M.G. ; TAKAI, S.; VARGAS, A.C.; MATTOS G, A.L. ; CAMELLO, T.C.F.; OHNO, R. ; OKANO, H. ; SILVA, A.V. Identification of virulence associated plasmids in *Rhodococcus equi* in humans with and without acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 85, p. 510-513, 2011b.
- RIBEIRO, M.G.; VARGAS, A.C. Rodococose. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças Infeciosas em animais de produção e de companhia**. p. 458-477. 2016.
- RINGUET, H.; AKOUA-KOFFI, C.; HONORE, S.; VARNEROT, A.; VINCENT, V.; BERCHE, P. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing. **Mycobacteria**. 37, 852-57, 1999.
- ROBINSON, T.G.; BODMER, R.E. Towards wildlife management in tropical forests **Journal of Wildlife Management**, minasha, v.63, p. 1-13, 1999.
- ROCHA, V.C M.; CORRÊA, S.H.R.; SETZER, A.P.; CATÃO-DIAS, J.L.; RAMOS, M.C.; FIORI, W.; IKUTA, C.Y.; FERREIRA NETO, J.S. *Mycobacterium kansasii* isolation from captive South American coati (*Nasua nasua*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 44, n. 1, p. 167-168, 2013.
- ROCHA, V.C.M.; IKUTA, C.Y.; GOMES, M.S.; QUAGLIA, F.; MATUSHIMA, E.R.; FERREIRA NETO, J.S. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from captive *Ateles paniscus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 5, p. 593-594, 2011.

- ROSEMBERGER, G. **Enfermedades de los bovinos**. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur, v.2, p. 139-51, 1983.
- RZEWUSKA, M.; WITKOWSKI, L.; CISEK, A.A.; STEFAŃSKA, I.; CHROBAK, D.; STEFANIUK, E.; KIZERWETTER-ŚWIDA, M.; TAKAI, S. Characterization of *Rhodococcus equi* isolates from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*). **Veterinary Microbiology**. v.172, p.272-278, 2014.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SANTOS D.O.; MENDES A; NOGUEIRA S; NOGUEIRA-FILHO S.L.G. Criação comercial de caititus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.10, p. 1-10, 2009.
- SAKAI, M.; OHNO, R.; HIGUCHI, C.; SUZUKI, K.; MAEDA, K.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TAKAI, S. Isolation of *Rhodococcus equi* from wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, v.48, n.3, p.815-817, 2012.
- STANFORD, J.; STANFORD C. Mycobacteria and their world. **International Journal of Mycobacteriology**. v.1:3, p.12, 2012.
- SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Rodococoses. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.1032–1033.
- SILVA F. **Mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul; 1984.
- SILVA, J.V.; DIAS, H.L.; ALBUQUERQUE, N.I.; NEGRÃO, A.M.G. Brucelose, Leptospirose e Tuberculose em caititu (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro. In: **Congresso brasileiro de medicina veterinária**, 28., 2001, Salvador. p. 12-13, 2001.
- SILVA, V.S.; MORES, N.; DUTRA, V.D.; FERREIRA NETO, J.S.; SAAD, M.H.F. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 562-66, 2000.
- SLUTSKY, A.M.; ARBEIT, R.D.; BARBER, T.W.; RICH, J.; VON REYN, C.F.; PIECIAK, W.; BARLOW, M.A.; MASLOW, J.N. Polyclonal infections due to *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS detected by pulsed-field gel

- electrophoresis of sequential clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.7, p.1773-1778, 1994.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Canone. p.149-152, 2007.
- SOMOSKOVI, A.; SALFINGER, M. Nontuberculous mycobacteria in respiratory infections: advances in diagnosis and identification. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 271-295, 2014.
- SOWLS, L.K. **The peccaries**. Tucson: University of Arizona Press, 1984.
- SOWLS LK. Javelinas and other peccaries. In: **Their biology, management and use**. 2 ed. Texas: Texas A and M University Press. p.325, 1997.
- TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 167–176, 1997.
- TAKAI, S.; ANZAI, T.; YAMAGUCHI, K.; KAKIZAKI, S.; TAKAHAGI, J.; SATO, Y.; TAKEHARA, F.; TAMADA, Y.; MATSUKURA, S.; TANI, A.; KATO, M.; SENO, N.; SASAKI, N.; TSUBAKI, S.; KAMADA, M. Prevalence of virulence plasmids in environmental isolates of *R. equi* from horse–breeding farms in Hokkaido. **Journal of Equine Science**, v.5, p.21–25, 1994.
- TAKAI, S.; FUKUNGA, N.; OCHIAI, S. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.4, p.1034–1037, 1996.
- TAKAI, S.; IMAI, Y.; FUKUMAGA, Y. et al. Identification of virulence–associated plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. **Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.1306–1311, 1995b.
- TAKAI, S.; IKEDA, T.; SASAKI, Y. et al. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15–to 17–kilodalton antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.1624–1627, 1995a.
- TAKAI, S.; MURATA, N.; KUDO, R.; NAREMATSU, N.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. *Rhodococcus equi* pneumonia in a crossbred foal in Kumamoto: clinical isolates contained new virulence plasmids, 90–kb type III and type IV. **Veterinary Microbiology**, v.82, p. 373–381, 2001.
- TAKAI, S.; SHODA, M.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; FORTIER, G.; PRONOST, S.; RAHAL, K.; BECU, T.; BEGG, A.; BROWNING, G.; NICHOLSON,

- V.M.; PRESCOTT, J.F. Genetic analysis of virulent *R. equi* based on restriction fragment length polymorphism of virulence plasmids: a molecular approach for epidemiology of virulent *R. equi* in the world. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3417–3420, 1999.
- TAKAI, S.; SYAKALIMA, M.; YASUDA, J.; SASAKI, Y.; TSUTSUMI, H.; MIYAGAWA, E.; WADA, K.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; SUGIMOTO, C. Isolation of *Rhodococcus equi* from feces of indigenous animals and soil from the Lower Zambezi National Park and Lochinvar Park, Zambia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 6, p.743–746, 2004.
- TAKAI, S.; THARAVICCHITKUL, P.; SASAKI, C.; ONISHI, Y.; YAMANO, S.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; TRINARONG, C.; ROJANASTHIEN, S.; SIRIMALAISUWAN, A.; TESAPRATEEP, T.; MANEEKARN, N.; SIRISANTHANA, T.; KIRIKAE, T. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with acquired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. **Amerinan Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.66, n.1, p.52–55, 2002.
- TAKAI, S.; THARAVICHITKUL, P.; TAKARN, P.; KHANTAWA, B.; TAMURA, M.; TSUKAMOTO, A.; TAKAYAMA, S.; YAMATODA, N.; KIMURA, A.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; MANEEKARN, N.; SIRISANTHANA, T.; KIRIKAE, T. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patients with and without acquired immune deficiency syndrome in Chiang Mai, Thailand. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188, p.1717–1723, 2003.
- TAKAI, S.; WATANABE, Y., IKEDA, T., OZAWA, T., MATSUKURA, S., TAMADA, Y., TSUBAKI, S., SEKIZAKI, T. Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.1726–1729, 1993.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, n. 10, p. 512-526, 1993.
- TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

- THOEN, C.O.; KARLSON, A.G.; HIMES, E.M. *Mycobacterium tuberculosis* complex. In: Kubica, G.P.; WAYNE, L.G. **The Mycobacteria: a sourcebook**. New York, Marcel Dekker, Part B. p. 1209-35, 1984.
- THEIMER, T.C.; KEIM P. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome B DNA sequences. **Journal of Mammalogy**. v. 79, p. 566-572, 1998.
- TKACHUK–SAAD, O.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2696–2700, 1991.
- TORTOLI, E.; GITTI, Z.; KLENK, H.P.; LAURIA, S.; MANNINO, R.; MANTEGANI, P.; MARIOTTINI, A.; NEONAKIS, I. Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium terrae* complex and description of *Mycobacterium engbaekii* sp. nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 401-411, 2013.
- UNE, Y.; MORI, T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v.30, n. 5-6, p. 415-425, 2007.
- VALERO-RELLO, A.; HAPESHI, A.; ANASTASI, E.; ALVAREZ, S.; SCORTTI, M.; MEIJER, W.G.; MACARTHUR, I.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. An invertron-like linear plasmid mediates intracellular survival and virulence in bovine isolates of *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**. v. 83, p. 2725–2737, 2015.
- VAN INGEN J.; RAHIM, Z.; MULDER, A.; BOEREE, M.J.; SIMEONE, R.; BROSCHE, R.; VAN SOOLINGEN. D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. **Emerging Infectious Diseases Journal**. v.18, p. 653-655, 2012.
- VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P.E.W.; HERMANS P.W.M.; VAN EMBDEN, J.D.A. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 235, p. 196-205, 1994.
- VARGAS, A.C.; MONEGO, F.; GRESSLER, L.T.; BOTTON, S.A.; COSTA, M.M.; ECCO, R.; RIBEIRO, M.G.; LARA, G.H.B.; TAKAI, S. Bronchopneumonia in wild boar (*Sus scrofa*) caused by *Rhodococcus equi* carrying the VapB type 8 plasmid. **BMC Research Notes**, v.6, p.111, 2013.

- VEIGA, F.B.; TOURRAND, J.F.; QUANZ, D. Agropecuária na Transamazônica. O caso do município de Urará. **Documento de Pesquisa. EMBRAPA**, Belém, p.1-54, 1995.
- VERVILLE, T.D.; HUYCKE, M.M.; GREENFIELD, R.A.; FINE, D.P.; KUHL, T.L.; SLATER, L.N. *Rhodococcus equi* infections in humans. **Medicine**, v.73, p.119–132, 1994.
- WAGNER, D.; YOUNG, L.S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. **Infection**. v.32, p.257–270, 2004.
- 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. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.
- WETTERBERG, G.B.; FERREIRA, M.; BRITO, W.L.S; ARAUJO, V.C. Fauna Amazônia preferida como alimento. Brasília: **PRODEPEF**, p.24, 1976.
- WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 1, n. 4, p. 269-273, 1992.
- WITKOWSKI, L.; RZEWUSKA, M.; TAKAI, S.; KIZERWETTER-SWIDA, M.; KITA, J. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* in slaughtered swine, cattle and horses in Poland. *BMC Microbiology*, 2016. DOI: 10.1186/s12866-016-0712-9.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Consolidated guidelines on HIV Prevention, Diagnosis, Treatment and care for key populations. **World Health Organization, Geneva**, Switzerland. p.180, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global Tuberculosis Report**. 20th edition. p.204, 2015.
- YUYAMA, T.; YUSA, S.; YOSHIZUMI, K.; YAMANO, S.; MURATA, S.; HIROSE, T. OSANAI, R.; ONISHI, Y.; OSATO, S. SASAKI, C.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* in thoroughbred horses in Kagoshima. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p. 715–718, 2002.

ZANETTI, S.; BUA, A.; MOLICOTTI, P.; DELOGU, G.; MURA, A.; ORTU, S.; SECHI, L.A. Identification of mycobacterial infections in wild boars in Northern Sardinia, Italy. **Acta Veterinaria Hungarica.**, v.56, n.2, p.145-152, 2008.

ZINK, M.C.; YAGER, J.A.; SMART, N.L. *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958–1984: A review of 131 cases. **Canadian Veterinary Journal**, v.27, p. 213–217, 1986.

10. ANEXO

10.1 Anexo 1 - Permissão de importação do Ministério da Agricultura, Florestal e da Pesca do Japão

家畜の伝染性疾病の病原体の輸入に関する届出確認書 CONFIRMATION CERTIFICATE OF IMPORT NOTIFICATION OF CAUSATIVE AGENTS OF ANIMAL INFECTIOUS DISEASES	
整理番号 Reference No.	YC - GI - 265
発行年月日 Date of Issue.	August 24, 2016
<p>下記は、家畜伝染病予防法第36条の2第1項の規定により、動物検疫所を經由して輸入の届出がなされたことを確認する。</p> <p>This is to confirm that the undermentioned article was notified of import through Animal Quarantine Service under Article 36-2 paragraph 1 of the Domestic Animal Infectious Diseases Control Law.</p>	
届出者住所氏名 Name & address of notified person	青森県十和田市東23番町35-1 北里大学獣医学部 学部長 獣医衛生学教室教授 高井 伸二
病原体の名称 Name of causative agent	Rhodococcus equi
数量 Total quantity	130菌株 130バイアル 1こうり
荷送人住所氏名 Name & address of consignor	Dr. Marcio Garcia Ribeiro Infectious Diseases of Domestic Animals College of Veterinary Medicine-UNESP, State of Sao Paulo, Brazil
<p>農林水産省動物検疫所 Animal Quarantine Service Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan</p>	

10.2 Anexo 2 - Certificado Zoosanitário Internacional para exportação de micro-organismos emitido pelo MAPA, Brasil

08/02/2016

:: SEI / MAPA - 0951958 - Autorização ::



MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO
RUA TREZE DE MAIO, 1558, 4º ANDAR - Bairro Bela Vista, São Paulo/SP, CEP 01327-002
Telefone: 11-3251-0400 / 3251-5742 e Fax: - http://www.agricultura.gov.br

AUTORIZAÇÃO PARA EMISSÃO DO CERTIFICADO ZOOSSANITÁRIO INTERNACIONAL

U.F.: SP	Regional: SSA	Espécie: material de pesquisa	Nº Sequencial: 824/2016
----------	---------------	-------------------------------	-------------------------

MERCADORIA

Identificação: Estirpes de *Rhodococcus equi*

Quantidade: 130 amostras

Finalidade: Pesquisa científica

Exportação: () temporária (X) definitiva

EXPORTADOR

Nome: Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Estabelecimento exportador: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP

Endereço: Distrito de Rubião Júnior, s/n - Botucatu/SP - CEP: 18618-970

DESTINO DA MERCADORIA

País de destino: Japão

País de trânsito: ---

Nome do importador: Department of Veterinary Hygiene

Estabelecimento importador: Kitasato University, Japão

Endereço: Towada, Aomori, 034-8628

Local de egresso do Brasil – UVAGRO ou SVA: SVA-Guarulhos/SP

Meio de transporte: Aéreo

AUTORIZO A EXPORTAÇÃO, em cumprimento das normas legais vigentes e das exigências sanitárias do país importador, devendo ser expedido o CZI conforme modelo Ref CE.GERAL.ORIG.H.N.07

1. A mercadoria acima identificada somente poderá ser exportada quando:
 - a. no caso de animais vivos, estes deverão ser transportados diretamente para o local de quarentena, acompanhados da Guia de Trânsito Animal – GTA.
 - b. No caso de material de multiplicação animal, os mesmos deverão ser transportados diretamente do estabelecimento exportador, indicado na presente autorização, acompanhados de toda documentação relacionada no CZI.
2. A presente autorização é válida somente para a saída pelo local indicado e por um período de 15 dias, contados a partir da data de expedição e considerando a validade dos exames. Excepcionalmente, a critério do SSA emitente da autorização, este prazo de validade poderá ser estendido.
3. A presente autorização poderá ser cancelada a qualquer momento, a critério do Departamento de Saúde Animal.

LOCAL DE EMISSÃO: São Paulo/SP



Documento assinado eletronicamente por GRACIANA CORREA ROMITTO, Auditor(a) Fiscal Federal Agropecuário, em 05/09/2016, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 10, parágrafo 2º, da Medida Provisória nº 2.200-2, de 24 de Agosto de 2001.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sistemas.agricultura.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0951958 e o código CRC E0DF1A29.

file:///C:/Users/WINDOV/SK/2016/Desktop/_%20SEI%20-%20MAPA%20-%200951958%20-%20Autoriza%C3%A7%C3%A3o%20_.html

1/2

08/02/2016

:: SEI / MAPA - 0951958 - Autorização ::



Referência: Processo nº 21052.017066/2016-79

SEI nº 0951958

11. ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Tropical Animal Health and Production.

Instructions for Authors

AUTHORSHIP POLICY

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

TYPES OF ARTICLES

Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence.

Regular Articles: Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the journal including illustrations and tables. Articles should be structured into the following sections;

- (a) Abstract of 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be presented as a single continuous paragraph without subdivisions.
- (b) Introduction stating purpose of the work
- (c) Materials and Methods
- (d) Results
- (e) Discussion (conclusions should be incorporated in the discussion!)
- (f) Acknowledgements
- (g) Statement of Animal Rights
- (h) Conflict of Interest Statement
- (i) References

Short Communications and Technical Notes: Short Communications and Technical Notes should not normally exceed approximately 2000 words or about 4 pages of the journal, including illustrations, tables and references. An abstract of 150-250 words should be included and a minimum number of sub-headings may be included if it adds clarity to the article.

Short Communications report original scientific data.

Technical Notes describe innovative methodologies.

Reviews: Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the Editor-in-Chief in advance.

Correspondence: Letters on topics relevant to the aims of the Journal will be considered for publication by the Editor-in-Chief who may modify them.

It is the authors responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and free sample articles on the springer.com journal homepage.

ETHICAL STANDARDS

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Costs of Color Illustrations

Online publication of color illustrations is always free of charge.

For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Please note:

Use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document.

REFERENCES

1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list.

2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 12--16)'

3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with co-authors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc.

5. Use the following system for arranging each reference in the list:

- For journal articles:

Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245--268

- For books:

Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London)

- For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multi-author books:

Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 68--79

- For unpublished theses, memoranda etc:

Crowther, J., 1980. *Karst water studies and environment in West Malaysia*, (unpublished PhD thesis, University of Hull)

- For Online documents:

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999

6. Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references.

7. Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in non-Latin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added.

8. Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

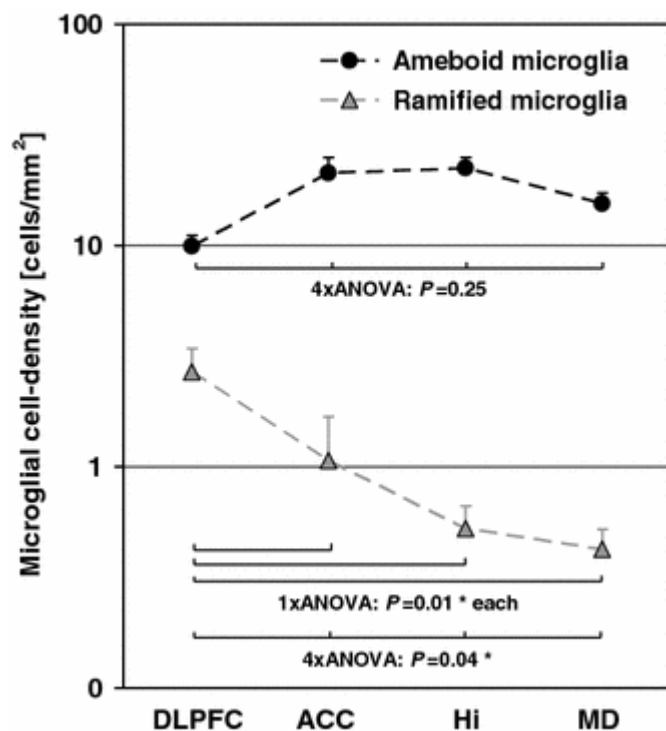
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

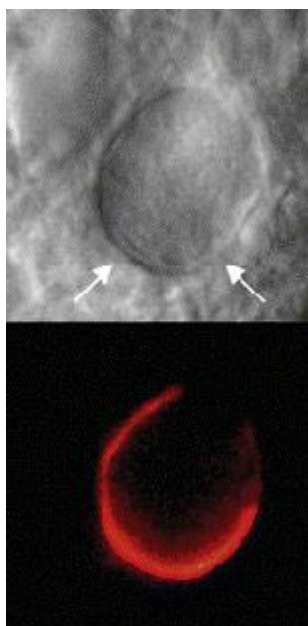
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

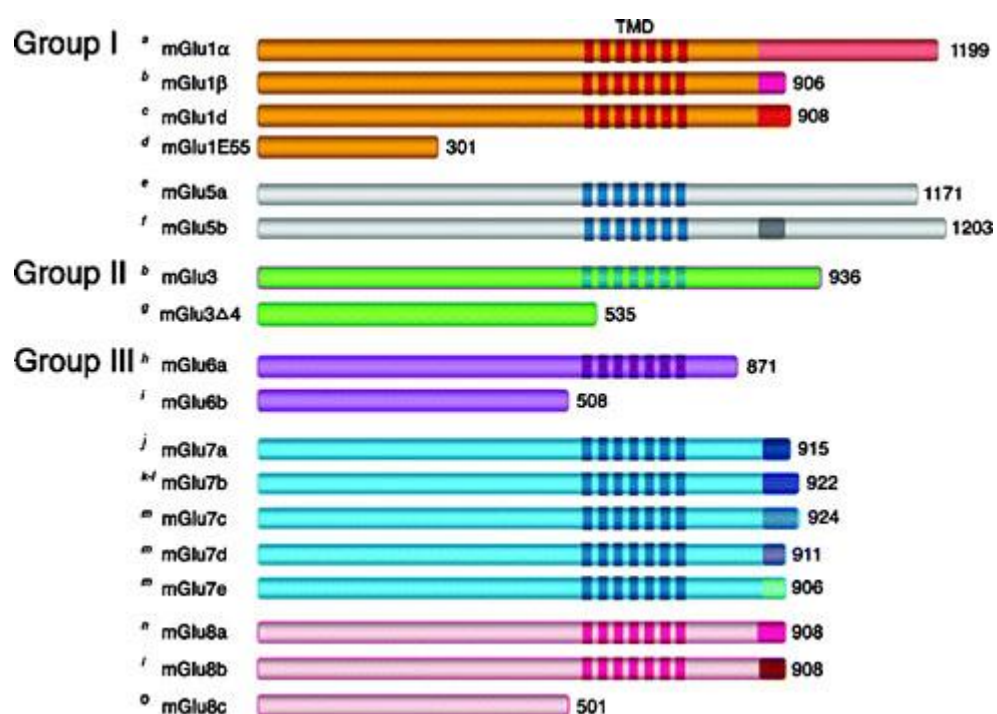


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights

for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

[here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

For retrospective studies, please add the following sentence:

"For this type of study formal consent is not required."

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

[Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](#)

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

1 **Identification of *Mycobacterium* species and investigation of virulence-associated proteins in**
2 ***Rhodococcus equi* strains from the lymph nodes of captive *Tayassuidae* species**

3 Amanda Bonalume Cordeiro de Morais¹, Carmen Alicia Daza Bolaños¹, Ana Carolina Alves¹, Cássia Yumi Ikuta²,
4 Gustavo Henrique Batista Lara¹, Marcos Bryan Heinemann², Rogério Giuffrida⁴, Fernando Paganini Listoni¹,
5 Mateus de Souza Ribeiro Mioni¹, Shinji Takai³, Márcio Garcia Ribeiro¹.

6 ¹ UNESP - São Paulo State University, Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine
7 and Animal Sciences, Botucatu, SP, Brazil

8 ² Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, University of São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brazil

9 ³ Department of Animal Hygiene, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, Japan

10 ³ UNOESTE – University of Oeste Paulista, School of Veterinary Medicine, Presidente Prudente, SP, Brazil

11

12 **Abstract** - Virulence-associated proteins (*vapA*, *vapB* and *vapN* genes) of *Rhodococcus equi* and
13 *Mycobacterium* species isolated from 330 lymph nodes of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) and white-lipped
14 peccaries (*Tayassu pecari*) intended for human consumption were investigated. Thirty-six (10.9%) *R. equi*
15 strains were isolated, 3.3% (11/330) from white-lipped peccary and 7.6% (25/330) of collared peccary lymph
16 nodes. Among the 11 isolates of *R. equi* of the white-lipped peccaries, 90.9% (n = 10/11) were obtained from
17 mesenteric lymph nodes and only 9.1% (n = 1/10) of the mediastinal lymph node. In the 25 isolates of *R. equi*
18 obtained from collared peccaries, 40.0% (10/25) were recovered from mesenteric lymph nodes, 36% (9/25) from
19 submandibular, and 24.0% (6/25) from mediastinal ones. No *vapA*, *vapB*, and *vapN* genes (plasmidless type)
20 were identified among *R. equi* isolates. *Mycobacterium* sp. was isolated in 3.03% (10/330) of all lymph nodes
21 analyzed. Among the 10 mycobacterial isolates, 60% (n = 6/10) were from white-lipped peccary, and 40% (4/10)
22 from collared peccary lymph nodes. Ten *Mycobacterium* species were detected by PCR-PRA, with
23 predominance of *M. avium* type 1. Sequencing of *hsp65* and *rpoB* genes revealed mycobacteria that were
24 saprophytic (*M. sinense*, *M. kumamotonense*) and potentially pathogenic (*M. colombiense*, *M. intracellulare*) to
25 humans and animals. To our knowledge, this is the first description of *R. equi* and/or mycobacteria species
26 identified in the lymph nodes of *Tayassuid* specimens. Despite the absence of Vap genes, the identification of *R.*
27 *equi*, as well as nontuberculous and saprophytic mycobacteria highlight the risk of transmission of these
28 pathogens from *Tayassuidae* species to humans by means of meat or meat products contaminated with lymph
29 node contents, since *R. equi* plasmidless type and mycobacterial species described here have been reported as

30 causes of pulmonary and extrapulmonary infections both in immunocompetent and immunocompromised
31 humans.

32 **Keywords** - *Tayassuidae* species, collared peccary, white-lipped peccary, mycobacteria, rhodococcosis.

33 **Introduction**

34 *Mycobacterium* species and *Rhodococcus equi* (*R. equi*) are major microorganisms recovered from both
35 granulomatous/pyogranulomatous lesions and apparently normal lymph nodes of pigs, worldwide (Takai et al.,
36 1996; Makrai et al., 2002; LARA et al., 2015). In spite of this findings, the impact of these pathogens in lymph
37 node infections in *Tayassuidae* species is poorly understood, at the same time that there is an increase in human
38 consumption of meat from this wildlife animal species (Miler and Fowler, 2014).

39 The genus *Mycobacterium* includes several species classified in three groups of relevance for animal
40 and public health: (i) obligatory pathogens of humans and animals, (ii) microorganisms potentially pathogenic to
41 animals and humans (non-tuberculous or opportunistic mycobacteria), and (iii) saprophytic, ubiquitous, or
42 environmental species. *M. avium* subsp. *avium* (*M. avium*) belongs to the *Mycobacterium avium-intracellulare*
43 complex (Satanford e Stanford, 2012), which is classified as a potentially pathogenic mycobacterium group, and
44 has been described as the main agent of lymphadenitis in pigs (Leão et al., 1999; Lara et al., 2011). In humans,
45 *M. avium* predominantly causes pneumonia and, less frequently, extrapulmonary infections, mainly affecting
46 mainly people living with the human immunodeficiency virus (HIV) / acquired immunodeficiency syndrome
47 (AIDS) (Somoski and Salfinger, 2014).

48 *R. equi* infections are commonly restricted to the lymphatic system of pigs, causing submandibular and
49 mesenteric lymphadenitis (Prescott, 1997). The occurrence of human rhodococcosis has increased globally, and
50 the disease will represent an emergent health problem in the coming years (Shahani, 2014). *R. equi* typically
51 causes pyogranulomatous bronchopneumonia in both immunosuppressed and immunocompetent patients,
52 especially among people living with HIV/AIDS (Takai et al., 2003).

53 *R. equi* pathogenicity has been attributed to the presence of plasmid-encoded virulence-associated
54 proteins (Vap), which are apparently essential to the survival of pathogen into phagocytic cells (Meijer and
55 Prescott, 2004). Vaps harbor pathogenicity islands that contain distinct genes (Vázquez-Boland et al., 2013). In
56 turn, a conserved conjugal transfer protein gene (*traA*) is a virulence factor common to all *R. equi* strains

57 harboring plasmids (Ocampo-Sosa et al., 2007). Over the last decades, pathogenic strains have been
58 conventionally classified as virulent and intermediately virulent, respectively, based on harboring a circular large
59 plasmid that encodes virulence-associated protein A (VapA or traA+/A+B-) or B (VapB or traA+/A-B+) (Meijer
60 and Prescott, 2004; Ocampo-Sosa et al., 2007). Intermediately virulent *R. equi* strains are frequent in the lymph
61 nodes of pigs (“pig-type”), wild boars (Ribeiro et al., 2011a), and curiously, humans, particularly
62 immunocompromised patients (Takai et al., 2003; Ribeiro et al., 2011b; Makrai et al., 2002). Opposingly,
63 virulent *R. equi* strains are typical causal agents of a life-threatening suppurative pneumonia in foals (“horse-
64 type”) aged up to six months. Strains that lack *vapA* and *vapB* genes (traA-/AB- or plasmidless type) are usually
65 found in the feces of non-horses and non-pigs hosts, respectively, and in human infections, as well (Meijer and
66 Prescott, 2004; Ocampo-Sosa et al., 2007). However, they may hypothetically harbor other unnoticed Vaps.

67 Currently, a novel host-adapted *R. equi* linear virulence-plasmid that encodes virulence-associated
68 protein N (VapN or traA+/AB-) was described. This new type of protein associated with *R. equi* virulence
69 (pVapN) may apparently be isolated mainly from cattle (bovine type) (Valero-Rello et al., 2015); however the
70 pathogenicity of VapN isolates to domestic animals, wildlife, and humans is still uncertain. In addition,
71 similarities of *R. equi* VapB types obtained from humans and pigs indicate that pig-to-human infection may
72 occur by ingestion of pork contaminated with VapB strains from lymph nodes contents and/or feces, given the
73 lack of history of contact between people with rhodococcosis and domestic pig or pig breeding facilities (Takai
74 et al., 2003; Ribeiro et al., 2011b; Lara et al., 2015). In this scenario, the presence of *vapN*, *vapA*, and *vapB*
75 genes of *R. equi* was investigated, as well as mycobacteria species recovered from lymph nodes of slaughtered
76 Tayassuidae species intended for human consumption.

77

78 **Methods**

79 **Animals and bacterial strains**

80 The samples were collected from two distinct Tayassuidae breeding facilities located in two Brazilian States
81 (Sao Paulo e Goias), upon slaughter of the animals intended for human consumption. Sample collection was
82 authorized by the Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA). Although
83 110 animals were sampled, the minimum number of Tayassuidae specimens estimated for the study was 69,
84 based on the total of animals available for sampling (a finite population of 1,000 animals), estimated prevalence
85 of 5%, sensitivity of the test of 90%, and a 95% confidence level (Dohoo et al., 2010).

86 A total of 330 lymph nodes (110 mesenteric, 110 mediastinal, and 110 submandibular) from 55
87 collared and 55 white-lipped peccary were aseptically subjected to microbiological culture in CAZ-NB media for
88 selective isolation of *R. equi* (Lara et al., 2015), and to Stonebrink-Lesslie and Loewenstein-Jensen media, which
89 are selective for mycobacteria. Fragments of lymph nodes of all animals were aseptically cultured in CAZ-NB
90 media. Plates were incubated at 37°C under aerobic conditions, and were evaluated at 24, 48, and 72 h. For
91 *Mycobacterium* isolation, fragments of all lymph node samples were subjected to the Petroff decontamination
92 method (Lara et al., 2011) with some modifications, and subsequently cultured on Löwenstein-Jensen and
93 Stonebrink media. Samples were kept at 37°C in aerobic conditions up to 90 days. Colonies compatible with
94 mycobacteria were subjected to ZN staining for the identification of acid-fast bacillus (AFB). Colonies
95 suggestive of *R. equi* in CAZ-NB and mycobacteria in Stonebrink-Lesslie and/or Loewenstein-Jensen media
96 were subjected to conventional phenotypic classification (Quinn et al. 2011) and, subsequently, to further
97 molecular analysis.

98

99 *R. equi* DNA isolation and detection of virulence-associated proteins

100 Genetic material of *R. equi* strains was amplified using 10 µl of DNA extracted in 50 µL of volume
101 containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25 ° C), 50 mM KCl, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphates, 1.5 mM
102 MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polymerase, and 1 mM each primer. Samples were submitted to 30 cycles of
103 amplification, according to the following time / temperature conditions (cycles): denaturation for 90s at 94 ° C,
104 annealing for 1 min at 55 ° C, and extension for 2 min at 72 ° C. Detection of virulent (VapA) gene sequences
105 (15-17 kDa) was carried out using primer 1 (5'-GACTCTTCACAAGACGGT-3') and primer 2 (5'-
106 TAGGCGTTGTGCCAGCTA-3'), targeting an amplification sequence between 569 and 552 base pairs (bp).
107 For strains of intermediate virulence (VapB), primer 3 (5'-AACGTAGTCGCGGTGAGAA-3') and primer 4 (5'-
108 ACCGAGACTTGAGCGACTA-3') were used for the amplification of a gene between 240 and 258 bp (TAKAI
109 et al., 2002) (Takai et al., 2003). For the detection of VapN or "bovine type" strains, primer 5 (5'-
110 AGAGTTCATGCGTGACAACG-3') and primer 6 (5'-GTCCACAGGTCACCGTTCTT-3') were used
111 (Valero-Rello et al., 2015).

112

113

114 Mycobacterial DNA isolation and molecular diagnosis

115 Extraction and purification of DNA from *Mycobacteria* isolates were performed according to
116 previous studies (Van Soolingen et al., 1994; Bemer-Melchior and Drugeon, 1999). Restriction enzyme
117 polymerase chain reaction was used to identify non-tuberculous, opportunistic, or atypical mycobacteria species
118 (Telenti et al., 1993). In the technique, 2.5 µl of the extracted DNA were used, added of 10 pmol of each primer,
119 Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') and Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'). These
120 primers targeted heat shock protein 65 (*hsp65*), resulting in a 441 bp product. Cycles were as follows: one cycle
121 at 94°C for 10 min, 35 cycles at 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, and one final cycle at 72°C
122 for 10 min. The amplified fragment was digested by enzymes *BstEII* (Promega, WI, USA) and *HaeII*
123 (Invitrogen™, CA, USA). The profiles found were analyzed using the public domain bioinformatics tool
124 PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). For the purification of the samples, a commercial kit was used
125 (illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification™), and the amplicon was quantified by Nanodrop™. In all
126 samples, the sequencing was performed in forward and reverse direction, in the automatic sequencer ABI Prism
127 3500 DNA Sequences (Applied Biosystems, CA, USA). The phylogenetic tree was built based on the Neighbor-
128 Joining method (Saitou and Nei, 1987) with Mega7 software. As an internal root, sequences of *Mycobacteria*
129 species previously identified as belonging to the *M. avium* complex were used. A sequence of *Corynebacterium*
130 *bovis*, for the *rpob* gene, and *Nocardia* sp., for the *hsp65* gene, were used as outgroups, respectively. All
131 sequences were obtained from GenBank, and the nucleotide substitution model was calculated, as well (Tamura-
132 Nei, 1993). Statistical reliability was confirmed by the Bootstrap method with 1,000 replicates.

133 Chi-square or Fisher's tests, Cochran q test and Wilcoxon method were carried out to compare the
134 presence of the different microorganisms isolated in *Tayassudae* species versus detection of the virulence-
135 associated proteins of *R. equi*. The analysis was performed using R statistic program (R Development Core
136 Team, 2015, versão 3.2.3) at a significance level of 0.05.

137

138 **Results**

139 Thirty-six (10.9%) *R. equi* strains were isolated, from which 6.7% came from white-lipped peccary
140 (n=11/165), and 15.1% (n=25/165) from collared peccary lymph nodes. There was no significant difference
141 ($p>0.05$) in isolation rates in of *R. equi* in collared peccaries compared with white-lipped peccaries using

142 Fisher's tests. When using the Cochran's Q test in the white-lipped peccary and collared peccary, it is possible
143 to compare dependent frequencies. There was a significant difference ($p < 0.05$) in the isolation of *R. equi*
144 between the lymph nodes of the sampled animals. In contrast, the Wilcoxon method indicates that there is no
145 significant difference ($p > 0.05$) when the submandibular and mediastinal lymph nodes are compared for the
146 isolation of *R. equi*, besides a significant difference ($p < 0.05$) between the submandibular lymph nodes with the
147 mesenteric and mediastinal lymph nodes with the mesenteric. Among 11 *R. equi* strains recovered from white-
148 lipped peccaries, 90.9% ($n=10/11$) were obtained from mesenteric lymph nodes, whereas only 9.1% ($n =$
149 $1/11$) from mediastinal lymph nodes. Among 25 *R. equi* isolates from collared peccaries, 40.0% ($n=10/25$) were
150 from mesenteric, 36% ($n=9/25$) from submandibular, and 24.0% ($n=6/25$) from mediastinal lymph nodes. A
151 significant difference ($p < 0.05$) was observed in the isolation of *R. equi* in submandibular lymph nodes of
152 collared peccaries compared with white-lipped peccaries using Fisher's tests. There was no significant
153 difference in the isolation of *R. equi* in mediastinal lymph nodes ($p > 0.05$) using Fisher's tests. *versus*
154 mesenteric lymph nodes ($p > 0.05$) using Chi-square test in relation to the two Tayassuidae species. The
155 Cochran's Q test applied in the white-lipped peccary group showed significant difference ($p < 0.05$) in the
156 isolation of *R. equi* between the lymph nodes of the samples animals, as opposed the Wilcoxon method that
157 indicates no significant difference ($p > 0.05$) between the submandibular and mediastinal lymph nodes when
158 compared with isolation of *R. equi*. However, there was a significant difference ($p < 0.05$) between the
159 submandibular lymph nodes with the mesenteric and mediastinal lymph nodes with the mesenteric. Using
160 Cochran's Q test only in the group of collared peccaries, no significant difference ($p > 0.05$) was observed in the
161 isolation of *R. equi* between the lymph nodes of the animals sampled. No *vapA*, *vapB*, or *vapN* genes were
162 detected in *R. equi* isolates, which were considered plasmidless types (avirulent).

163 Colonies compatible with *Mycobacteria* species were observed in 3.03% ($n=10/330$) of the lymph
164 nodes cultured. Among 10 mycobacterial isolates, 60.0% ($n=6/10$) and 40.0% ($n=4/10$) lymph nodes were from
165 white-lipped peccaries and collared peccaries, respectively. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the
166 isolation of mycobacteria in white-lipped peccaries *versus* collared peccaries using Fisher's tests. Among the
167 white-lipped peccaries, all mycobacterial isolates were from submandibular lymph nodes, whereas in collared
168 peccaries all strains were isolated from mesenteric lymph nodes. There was no significant difference ($p > 0.05$) in
169 the superior detection of *Mycobacterium* sp. in submandibular lymph nodes of white-lipped peccaries compared
170 with collared peccaries using Fisher's tests. Among collared peccaries, all strains were isolated from mesenteric
171 lymph nodes. There was no significant difference ($p > 0.05$) in *Mycobacterium* sp. identification in mesenteric

172 lymph nodes of collared peccaries in relation to mesenteric lymph nodes of white-lipped peccaries using Fisher's
173 tests. Cochran's Q test applied in white-lipped peccary and collared peccary showed there was no significant
174 difference ($p > 0.05$) in the isolation of *Mycobacterium* sp between the lymph nodes of the animals sampled.
175 Likewise, using Cochran's Q test in the group of white-lipped peccary and collared peccary separately, no
176 significant difference ($p > 0.05$) was observed in the isolation of *Mycobacterium* sp between the lymph nodes of
177 the animals sampled.

178 Of the 330 lymph node samples sampled, 13.9% (n=46/330) showed isolation of *R. equi* and/or
179 *Mycobacterium* species. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the identification of pathogens studied
180 in white-lipped peccary *versus* collared peccary lymph nodes using Fisher's tests. From the total samples, 7.3%
181 (n=24/330) of the mesenteric lymph nodes were positive in the isolation of at least one of the pathogens
182 studied; from these, 4.5% (n=15/330) were submandibular, and 2.1% (n=7/330) were mediastinal lymph nodes.
183 There was a bias to greater isolation of the pathogens studied in mesenteric lymph nodes when compared to
184 mediastinal or submandibular lymph nodes. Only one sample from collared peccary mesenteric lymph node
185 showed simultaneous isolation of *R. equi* and mycobacteria.

186 Ten *Mycobacterium* species were detected by PCR-PRA (Table1), and sequencing of genes *hsp65* and
187 *rpoB* showed predominance of *M. avium* type 1, *M. colombiense*, *M. intracellulare*, and *M. kumamotoense*
188 (Figures 1 and 2).

189 **Discussion**

190 The study revealed 10.9% and 3.03% of identification of *R. equi* and *Mycobacteria* species,
191 respectively, from apparently normal lymph nodes of Tayassuidae species, a finding that is described for the first
192 time, to the best of our knowledge. Despite the absence of virulence-associated genes, the identification of *R.*
193 *equi*, nontuberculous or saprophytic mycobacteria is a public health concern, since these pathogens have
194 increasingly been reported causing pulmonary and extrapulmonary diseases, both in immunocompetent and
195 immunocompromised people (Satanford e Stanford, 2012; Vázquez-Boland et al., 2013; Somoski and
196 Salfinger, 2014; Who, 2016).

197 Peculiar geographic distribution of virulence-plasmid profile of *R. equi* in swine species has been
198 observed worldwide. In Europe, particularly in Hungary (Makrai et al., 2002; 2005) and Poland (Witkowski et
199 al., 2016), predominance of *R. equi* vapB type 5 in submandibular lymph nodes of pigs and wild boars (*Sus*

200 *scrofa*) was described (Rzewuska et al., 2014). Conversely, *R. equi* vapB types 1 and 2 were the most frequent
201 types of pathogens in Asia, described in Thailand (Takai et al., 2003) and Japan (Sakai et al., 2012). In South
202 America, more specifically in Brazil, a study that focused on virulence characterization of *R. equi* isolated from
203 lymph nodes of pigs and wild boars with and without lymphadenitis, described predominance of VapB type 8
204 strains, besides detection of type 1 and 29 (Lara et al., 2011).

205 In the coming years, given the similarities of VapB types of *R. equi* strains from humans and pigs, it is
206 hypothesized that pig-to-human infection might occur by ingestion of pork or pork products contaminated with
207 intermediately virulent strains from lymph nodes contents and/or feces, given the lack of history of contact
208 between human patients with rhodococcosis and domestic pigs or their environment (Takai et al., 2003; Ribeiro
209 et al., 2011b; Lara et al., 2015). In fact, this was the main motivation for the present study because, similar to
210 what occurs in pigs (Takai et al., 2003; Ribeiro et al., 2011a; Lara et al., 2011, 2015), these pathogens may be
211 transmitted from *Tayassuidae* to humans by means of meat or meat products contaminated with lymph node
212 contents. In the current study, no *vapA*, *vapB*, and *vapN* genes were detected in *R. equi* strains recovered from
213 the lymph nodes of *Tayassuidae* species. Nevertheless, the identification of this pathogen in apparently normal
214 lymph nodes represents a public health concern due to the increasing human consumption of meat from these
215 wildlife animal species (Miler and Fowler, 2014). In addition, different countries have reported human
216 rhodococcosis caused by plasmidless (avirulent) strains, including the USA (Verville et al., 1994), Japan (Takai,
217 1997), Thailand (Takai et al., 2002), Hungary (Makrai et al., 2002), and Brazil (Ribeiro et al., 2011). The
218 pathogenicity to humans of *R. equi* strains lacking typical Vaps could be related with other virulence factors,
219 such as the capsule, the exoenzymes oxidase and phospholipase C, as well as resistance of the pathogen to
220 conventional antimicrobials, particularly in immunosuppressed patients (Takai, 1997; Mejer and Prescott, 2004;
221 Ribeiro et al., 2011b); or pathogens with unreported virulence-associated plasmid profiles.

222 Despite the absence of typical VAPs in our isolates, studies in several countries focusing on the
223 virulence plasmid profile of *R. equi* have contributed to the investigation of pathogenicity, molecular
224 epidemiology (with emphasis in the geographic distribution of the types), and the risks that livestock, companion
225 animals, and wildlife pose as sources of infection to humans (Takai, 1997; Mejer and Prescott, 2004; Vázquez-
226 Boland et al., 2013).

227 *Mycobacterium* species are major causes of submandibular and mesenteric lymphadenitis, and
228 subsequent condemnation of pig carcasses (Leão et al., 1999; Straw et al., 2006; Lara et al., 2011). In addition,
229 evidence has supported that European wild boars (*Sus scrofa*) are important reservoirs of *Mycobacterium*
230 *tuberculosis* complex, due to the identification of the pathogen in the lymph nodes of these animals (Naranjo et
231 al., 2008). Similarly, 10 mycobacteria were detected in the Tayassuidae species sampled in the present study, 6
232 of them from submandibular and 4 from mesenteric lymph nodes of apparently normal aspect. This finding may
233 be related to the transmission of mycobacteria mainly by oral route, due to the wide distribution of pathogen in
234 the environment contaminating the soil, water, food, and utensils used in animal handling, and determining the
235 predominance of infections in the digestive tract, including its lymph nodes (Straw et al., 2006).

236 Most of the mycobacteria species identified by PCR-PRA in this study belonged to the *M. avium*
237 complex. Likewise, *M. avium* complex (MAC) has increasingly been reported in human mycobacteriosis causing
238 both pulmonary and extrapulmonary infections, especially in humans living with HIV (Satanford and Stanford,
239 2012; Somoski and Salfinger, 2014). *M. avium* type 1 was the causal agent of up 90% of patients affected by
240 clinical MAC complex infections and showing mainly serious respiratory problems (Kiehn et al., 1985; Slutsky
241 et al., 1994; Leão et al. 1999). Moreover, MAC complex has been described as the major cause of tuberculosis
242 in humans living with HIV elsewhere (INDERLIED et al. 1993).

243 Sequencing of the *hsp65* and *rpob* gene from our 10 isolates of mycobacteria revealed concordance of
244 70.0% and identity >96.0% compared with similar mycobacterial species deposited in GeneBank. This
245 molecular method enabled the identification of mycobacteria potentially pathogenic to humans and animals (*M.*
246 *colombiense* and *M. intracellulare*), as well as saprophytic or environmental mycobacteria (*M. kumamotonense*
247 and *M. sinense*) (Satanford e Stanford, 2012). The phylogenetic tree showed four clusters in the two sequenced
248 genes and confirmed, predominantly, mycobacteria belonging to the MAC complex (*M. intracellulare* and *M.*
249 *colombiense*), and of saprophytic origin (*M. kumamotonense* and *M. sinense*). *M. colombiense* and *M.*
250 *intracellulare* have been related to pulmonary and disseminated infections in humans (Murcia et a., 2006), as
251 well as other miscellaneous infections (osteomyelitis, synovitis, encephalitis, hepatitis), especially in patients
252 living with HIV (Stanford and Stanford, 2012; Somoski and Salfinger, 2014; Who, 2016). Similarly, *M.*
253 *kumamotonense* and *M. sinense* were reported causing pulmonary infections in immunocompromised patients
254 (Jarzembowski et al., 2008). Some discrepancy observed between PCR-PRA and sequencing results may be
255 attributed to the point changes in nucleotide sequences (deletions, insertions, transitions) that interfere with the

256 action of the restriction enzymes, leading to variations in the resulting fragments, and making it difficult to
 257 compare them with the standards in the PRA reference site (Ringuet et al., 1999).

258 *Tayassu tajacu* and *Tayassu pecari*, also called collared peccary and white-lipped peccary, respectively,
 259 are *Tayassuidae* species belonging to the Brazilian fauna (Oda et al., 2004). Globally, evidence has supported
 260 that besides commercial pigs (Lara et al., 2011), wild boars (Meng et al., 2009) and feral pigs may be potential
 261 reservoirs of mycobacterial species (Straw et al., 2006), including in apparently asymptomatic animals. In this
 262 scenario, the identification of potentially pathogenic mycobacteria in the apparently normal lymph nodes from
 263 *Tayassuidae* species, in the current study, represents a public health concern because these animals are
 264 slaughtered for human consumption. In addition, it may be emphasized that, similar to swine species,
 265 surveillance epidemiological studies focusing on of the main pathogens that affect these species, are of great
 266 importance in commercially slaughtered wildlife, particularly in relation to zoonotic pathogens, such as
 267 mycobacteria and *R. equi*.

268 **Compliance with ethical standards** - This study was carried out in accordance with the guidelines for
 269 the ethical use of animals approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-FMVZ-UNESP/Botucatu,
 270 state of São Paulo), Brazil, protocol number 101/2015/2013-CEUA.

271 **Conflicts of interest** - The authors declare that they have no conflicts of interest.

272 **References**

- 273 Acha, P.N., Szyfres, B., 2003. Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales
 274 Bacteriosis y Micosis. (Washington, Organizacion Panamericana de la Salud)
- 275 Bemer-Melchior, P., Drugeon, H. B., 1999. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing
 276 analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2350-2351.
- 277 Miler, R.E; Fowler, M.E. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*. 8th ed. 2014. 792p.
- 278 Inderlied, C.B., Kemper, C.A., Bermudez, L.E., 1993. The *Mycobacterium avium* complex, *Clinical Microbioly*
 279 *Reviews*, 6, 266-310.
- 280 Kiehn, T.E., Edwards, F.F., Brannon, P., Tsang, A.Y., Maio, M., Gold, J.W., Whimbey, E., Wong, B.,
 281 Mcclatchy, J.K., Armstrong, D., 1985. Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in
 282 immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial
 283 susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics, *Journal of Clinical*
 284 *Microbiology*, 21, n.2, 168 - 175.
- 285 Lara, G.H.B., 2013. Ocorrência e identificação molecular de espécies do gênero *Mycobacterium* e marcadores de
 286 virulência em linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos e das fezes de suínos de abatedouro.
 287 (tese), Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-
 288 UNESP.
- 289 Lara, G.H.B., Ribeiro M. G., Leite, C. Q. F., Paes, A.C., Guazzellia, A., Silvac, A. V., Santos, A. C. B., Listoni,
 290 F.J.P., 2011. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine
 291 and wild boars (*Sus scrofa*), *Research in Veterinary Science*, 90, 185-188.

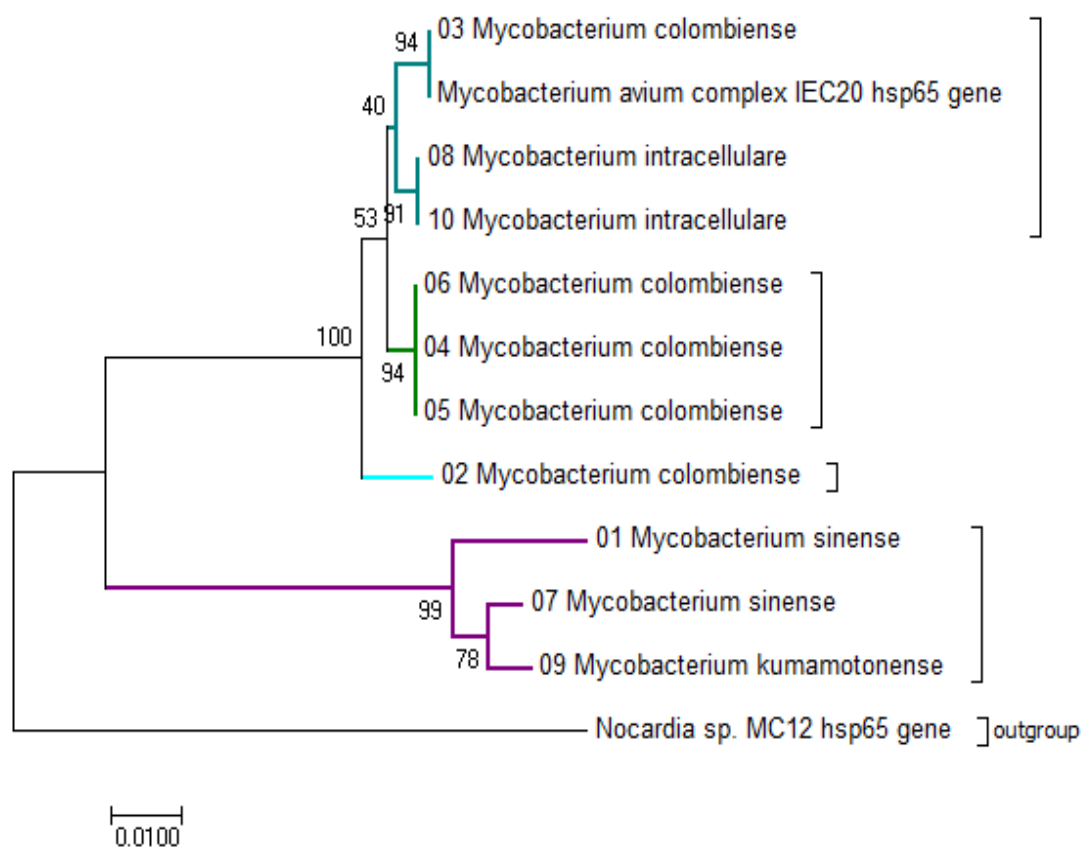
- 292 Lara, G.H.B., Takai, S., Sasaki, Y., Kakuda, T., Listoni, F.J.P., Riseti, R.M., de Moraes, A.B.C., Ribeiro, M.G.,
293 2015. VapB type 8 plasmids in *Rhodococcus equi* isolated from the small intestine of pigs and comparison
294 of selective culture media, *Letters in Applied Microbiology*, 61, 306-310.
- 295 Leão, S.C., Briones, M., Sircilli, M.P., Balian, S.C., Morés, N., Ferreira Neto, J.S., 1999. Identification of two
296 novel *Mycobacterium avium* allelic variants by PCR-restriction enzyme analysis (PRA) in pig and human
297 isolates from Brazil, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2592-2597.
- 298 Makrai, L., Takai, S., Tamura, M., 2002. Characterization of virulence plasmids in *R. equi* isolates from foals,
299 pigs, humans and soil in Hungary. *Veterinary Microbiology*, 88, 377-384.
- 300 Meijer, W.G., Prescott, J.F., 2004. *Rhodococcus equi*, *Veterinary Research*, 35, 383-396.
- 301 Meng, W.J., Lindsay, D.S., Sriranganathan, N., 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock
302 and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Serie B Biological Sciences* 364,
303 2697-2707
- 304 Naranjo, V., Gortazar, C.J., De La Fuente, J., 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of
305 *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology* 127, 1-9.
- 306 Oda, S.H.I., Bressan, M.C., Miguel, G.Z., Vieira, J. O., Faria, P.B., Savian, T.V., Kabeya, D.M., 2004. Efeito do
307 método de abate e do sexo sobre a qualidade da Carne de Capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), *Ciência e*
308 *tecnologia de alimentos*, 24, 236-242.
- 309 Ocampo-Sosa AA, Lewis DA, Navas J, Quigley F, Callejo R, Scortti M, et al. Molecular epidemiology of
310 *Rhodococcus equi* based on traA, vapA, and vapB virulence plasmid markers. *J Infect Dis*. 2007;196:763-9
- 311 Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Fitzpatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J., 2011. *Veterinary*
312 *Microbiology and Microbial Disease* (UK: Wiley-Blackwell).
- 313 Ribeiro, M.G., Takai, S., Vargas, A. C., Mattos G, A.L., Camello, T. C. F., Ohno, R., Okano, H., Silva, A. V.
314 2011a. Identification of virulence associated plasmids in *Rhodococcus equi* in humans with and without
315 acquired immunodeficiency syndrome in Brazil, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*,
316 85, 510-513.
- 317 Ribeiro MG, Lara GHB, Takai S, Guazzelli A, Silva AV, Fernandes MC, et al. Virulence genes and plasmid
318 profile in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. *Res Vet Sci*.
319 2011b.
- 320 Ringuet, H., C. Akoua-Koffi, S., Honore, A., Varnerot, V., Vincent, Berche, P., 1999. *hsp65* sequencing for
321 identification of rapidly growing, *Mycobacteria*, 37, 852-57.
- 322 SAKAI, M.; OHNO, R.; HIGUCHI, C.; SUZUKI, K.; MAEDA, K.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TAKAI, S.
323 Isolation of *Rhodococcus equi* from wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, v.48,
324 n.3, p.815-817, 2012.
- 325 Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees,
326 *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- 327 Shahani L. *Rhodococcus equi* pneumonia and sepsis in al allogenic haematopoietic stem cell transplant recipient.
328 *BMJ Case Report*. 2014. doi: 10.1136/bcr-2014-204721
- 329 Stanford, J., Stanford C., 2012. *Mycobacteria and their world*, *International Journal of Mycobacteriology*, 1, 1 -
330 12.
- 331 Slutsky, A.M., Arbeit, R.D., Barber, T.W., Rich, J.; Von Reyn, C.F., Pieciak, W., Barlow, M.A., Maslow, J.N.,
332 1994. Polyclonal infections due to *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS detected by
333 pulsed-field gel electrophoresis of sequential clinical isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1773-
334 1778.
- 335 Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J., 2006. *Diseases of Swine*, ninth ed. Blackwell
336 Publishing, Ames, p. 1153.
- 337 Sobestiansky, J., Barcellos, D.E.S.N., 2007. Doenças dos suínos. (Goiânia, Canone).
- 338 SOMOSKOVI, A.; SALFINGER, M. Nontuberculous mycobacteria in respiratory infections: advances in
339 diagnosis and identification. *Clinics in Laboratory Medicine*, Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 271-295, 2014
- 340 Takai, S., 1997. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review, *Veterinary Microbiology*, 56, 167-
341 176.
- 342 Takai, S., Tharavichitkul, P., Sasaki, C., Onishi, Y., Yamano, S., Kakuda, T., Tsubaki, S., Trinarong, C.,
343 Rojanasthien, S., Sirimalaisuan, A., Tesaprateep, T., Maneekarn, N., Sirisanthana, T., Kirikae, T., 2002.
344 Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with
345 acquired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic
346 animal farms in Chiang Mai, Thailand, *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 66, 52-55.

- 347 Takai, S., Tharavichitkul, P., Takarn, P., Khantawa, B., Tamura, M., Tsukamoto, A., Takayama, S., Yamatoda,
348 N., Kimura, A., Sasaki, Y., Kakuda, T., Tsubaki, S., Maneekarn, N., Sirisanthana, T., Kirikae, T., 2003.
349 Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patients with and
350 without acquired immune deficiency syndrome in Chiang Mai, Thailand. *The Journal of Infectious*
351 *Diseases*, 188, 1717–1723.
- 352 Tamura, K.; Nei., 1993. M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of
353 mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- 354 Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E. C., Bodmer, 1993. T. Rapid identification of
355 mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis, *Journal of*
356 *Clinical Microbiology*, 31, 175-178.
- 357 Tortoli, E., Gitti, Z., Klenk, H. P., Lauria, S., Mannino, R., Mantegani, P., Mariottini, A., Neonakis, I., 2013.
358 Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium terrae* complex and description of *Mycobacterium*
359 *engbaekii* sp. nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov,
360 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 401-411.
- 361 Valero-Rello, A., Hapeshi, A., Anastasi, E., Alvarez, S., Scortti, M., Meijer, W.G., Macarthur, I., Vazquez-
362 Boland, J.A., 2015. An invertron-like linear plasmid mediates intracellular survival and virulence in bovine
363 isolates of *Rhodococcus equi*, *Infection and Immunity*, 83, 2725–2737.
- 364 Van Soolingen, D., de Haas, P. E. W., Hermans P. W. M., VAN Embden, J. D. A, DNA fingerprinting of
365 *Mycobacterium tuberculosis*, *Methods in Enzymology*, 235, 196-205.
- 366 Vázquez-Boland JA, Giguère S, Hapeshi A, MacArthur I, Anastasi E, Valero-Rello A. *Rhodococcus equi*: the
367 many facets of a pathogenic actinomycete. *Vet Microbiol.* 2013;167:9-33.
- 368 Verville, T.D., Huycke, M.M., Greenfield, R.A., Fine, D.P., Kuhls, T.L., Slater, L.N, 1994. *Rhodococcus equi*
369 infections in humans. *Medicine*, 73, 119–132.
- 370 WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Global Tuberculosis Report. 20th edition. p.204, 2016.
371
372
373

374 **TABLE 1** - Molecular characterization by the PCR-PRA technique of species of the genus *Mycobacterium* in 10
 375 isolates obtained from taiassuideos lymph nodes. Brazil, 2016-2017

<i>Mycobacterium</i> species	Collared peccary	White-lipped peccary	Total
<i>M. avium</i> type 1	1/10 (10.0%)	2/10 (20.0%)	3/10 (30.0%)
<i>M. kumamotonense</i> type 1	2/10 (20.0%)	1/10 (10.0%)	3/10 (30.0%)
<i>M. colombiense</i> type 1	-	3/10 (30.0%)	3/10 (30.0%)
<i>M. intracellulare</i> type 3	1/10 (10.0%)	-	1/10 (10.0%)
Total	4/10 (40.0%)	6/10 (60.0%)	10/10 (100.0%)

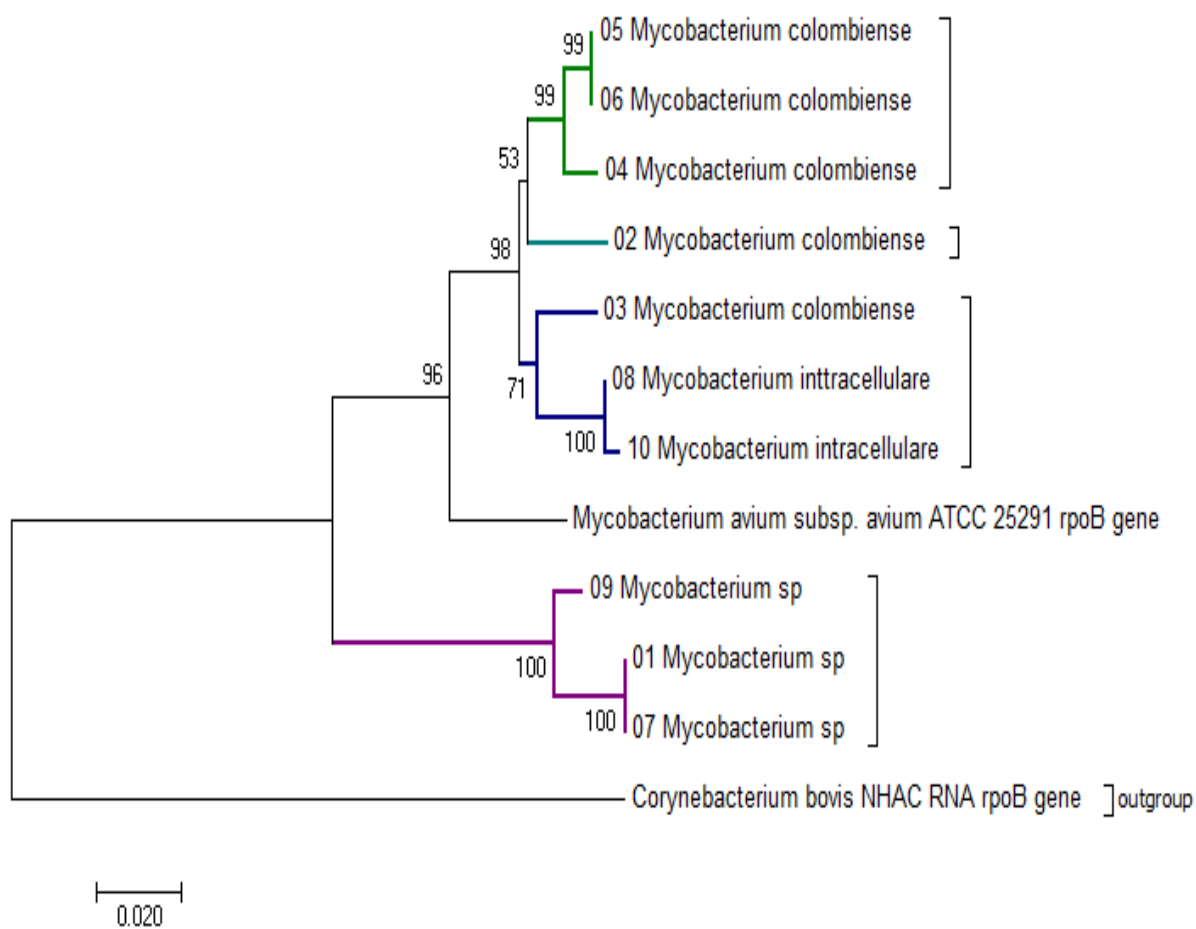
376



377

378

379 **FIGURE 1** - Phylogenetic relationship of the *hsp65* gene among mycobacteria species (*M. sinense*, *M.*
 380 *colombiense*, *M. intracellulare* and *M. kumamotonense*) identified in the lymph nodes of Tayassuidae. Brazil,
 381 2016-2017 (Phylogenetic tree analyzed by the Neighbor-Joining method, with 1,000 replications)



382

383 **FIGURE 2** - Phylogenetic relationship of the *rpoB* gene among mycobacteria species (*Mycobacterium* spp., *M.*
 384 *colombiense*, *M. intracellulare* and *M. kumamotoense*) identified in the lymph nodes of Tayassuidae. Brazil,
 385 2016-2017 (Phylogenetic tree analyzed by the Neighbor-Joining method, with 1,000 replications).