

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



**ICTB
MPCAL**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

LAINE WILMA FERREIRA DO NASCIMENTO

**PROCEDIMENTOS PARA ESTUDOS DE TUBERCULOSE EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS PARA USO CIENTÍFICO**

Rio de Janeiro

2018

LAINE WILMA FERREIRA DO NASCIMENTO

**PROCEDIMENTOS PARA ESTUDOS DIAGNÓSTICOS DE TUBERCULOSE EM
PRIMATAS NÃO HUMANOS PARA USO CIENTÍFICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB/Fiocruz, como um dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Cristina Ribeiro Andrade

Co-orientadora: Prof. Dra. Duanne Alves da Silva

Rio de Janeiro

2018

Ferreira do Nascimento, Laine Wilma.

PROCEDIMENTOS PARA ESTUDOS DIAGNÓSTICOS DE TUBERCULOSE EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PARA USO CIENTÍFICO / Laine Wilma Ferreira do Nascimento. - Rio de Janeiro, 2018.

101 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2018.

Orientadora: Márcia Cristina Ribeiro Andrade.

Co-orientadora: Duanne Alves da Silva.

Bibliografia: f. 93-100

1. Tuberculose. 2. Primatas não Humanos . 3. Diagnóstico. 4. Manejo Animal. 5. Controle Sanitário. I. Título.

LAINA WILMA FERREIRA DO NASCIMENTO

**PROCEDIMENTOS PARA ESTUDOS DE TUBERCULOSE EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS PARA USO CIENTÍFICO**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB/Fiocruz.

Aprovada em 26 de março de 2018.

Banca Examinadora:



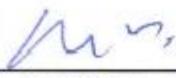
Prof.ª. Dr.ª Joseli Maria da Rocha Nogueira
(Escola Nacional de Saúde Pública/ENSP – Fiocruz)
(Presidente da Banca)



Prof. Dr. Renato Sergio Marchevsky
(Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Biomanguinhos – Fiocruz)



Prof. Dr. Wlamir Corrêa de Moura
(Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/INCQS – Fiocruz)



Prof.ª. Dr.ª Beatriz Goldschmidt
(Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos/ICTB – Fiocruz)
(Suplente Interno)



Prof. Dr. Luis Caetano Martha Antunes
(Escola Nacional de Saúde Pública/ENSP – Fiocruz)
(Suplente Externo)

Rio de Janeiro
2018

Com imensa saudade eu dedico este trabalho ao meu pai Paulo, responsável por parte do que sou hoje e ao meu marido Ayres Jr., pelo amor e por ser minha inspiração na busca pelo conhecimento (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Reconhecer e declarar-se grato por algo dado ou feito por outrem se traduz em agradecimento, por isso, sou grata a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente na realização deste trabalho bem como no meu crescimento profissional e pessoal.

Primeiramente, minha eterna gratidão à Dra. Márcia Cristina Ribeiro Andrade, por ter aceitado me orientar e pela oportunidade de estreitar nossos laços de amizade, que no sentido estrito, significa grande afeição, simpatia, apreço entre pessoas e foi este o sentimento que prevaleceu, principalmente durante as horas difíceis. Os acertos e os desacertos fazem parte do processo de construção, por isso, agradeço sua paciência, sapiência e benevolências com meus erros. Cumprindo seu papel de orientadora me ajudou a procurar, organizar e perseverar, mas seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos do currículo, aprendi lições importantes para minha vida. Cientista reconhecida pelo vasto conhecimento com primatas, hoje, tenho aspirações de, algum dia, adquirir uma fração do seu conhecimento.

À minha co-orientadora, Dra. Duanne Alves da Silva, por ter aceitado o desafio de desenvolver este trabalho conosco, pela presteza em me orientar sempre que precisei e pelas palavras de incentivo nos momentos críticos e de dúvidas que passei nestes dois anos.

À minha família, pelo apoio incondicional dado a mim nos bons e maus momentos da minha vida; especialmente à minha mãe Luzia, por ter me ensinado que o mérito de uma pessoa está no respeito às outras. Ao meu filho Ayan, por ser meu companheiro sempre. À minha cunhada, Cleonice, pela ajuda com as questões cotidianas durante este período e a minha “para sempre” sogra, D. Yhone, por ter me incentivado a prosseguir.

Ao curso de Mestrado Profissional em Ciência em Animais de Laboratório – MPCAL, pela oportunidade de fazer parte da primeira turma de uma pós-graduação, pioneira no Brasil, na área que outrora se desconsiderava ser ciência, e poder oferecer minha pequena contribuição para o avanço da Ciência em Animais de Laboratório. Um agradecimento especial à Dra. Maria Inês Doria Rossi, pelo empenho em coordenar o curso e à Dra. Joseli Nogueira, cuja dedicação embutida no exercício da licenciatura, é, para mim, uma fonte de inspiração.

À equipe da CPEA, por ter me acolhido durante este período e a cada membro do Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim), pelo primor com que desempenham o trabalho com os animais, o bem maior do serviço, e pela união mesmo nos momentos difíceis. Um agradecimento especial ao líder do SCPrim, Fábio Alves da Silva, por ter permitido meu ingresso ao MPCAL e por reconhecer a relevância do presente trabalho. Às amigas Dra. Beatriz Goldschmidt, por seus comentários sábios e pertinentes que sempre me ajudam a aperfeiçoar meu censo crítico e à Dra. Cláudia Andréa, que mesmo diante das dificuldades impostas pela vida, nunca desistiu de seus objetivos, sendo para mim um exemplo de perseverança.

Aos amigos Célia Lopes, Reinan Reis, Maria Aparecida (Tida), Júlio Cesar (Maguela), Juliana Linhares e Luiz Augusto Cianelle (Guto), que fazem parte da minha história de vida, sempre compartilhando alegrias e abrandando tristezas.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelo seus sonhos ou desistem deles”.

Augusto Cury

RESUMO

Os primatas não humanos (PNH) são altamente suscetíveis à tuberculose (TB), infecção capaz de dizimar criações mediante a ocorrência de um surto. O criadouro científico de PNH do Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), RJ, mantém um plantel de cerca de 700 primatas não humanos das espécies *Macaca mulatta*, *M. fascicularis* e *Saimiri* sp. destinados a pesquisas biomédicas. Um conjunto de medidas preventivas e de controle vem sendo adotadas no referido criadouro, desde a constatação de um surto de TB em 2011. Defrontando-se com esta problemática e na ausência de uma conduta padrão para lidar com as inúmeras variáveis que surgiram à medida que tal surto tomava grandes proporções, foi instituído um programa fundamentado em normas nacionais e internacionais que determinam a eutanásia dos animais positivos. Foram implantadas barreiras sanitárias, atentando-se para as questões de biossegurança, manejo animal, controle de acesso às criações símias, estudos acerca dos fluxos de rastreabilidade do bacilo da TB nas colônias, coletas de amostras biológicas, métodos de diagnóstico diversificados, destinação de carcaças, bem como gestão de pessoas quanto aos cuidados de prevenção à TB. O emprego de um conjunto de medidas de controle foi adotado para evitar a propagação do agente nas populações animais. De 2011 até o presente ano os casos de TB vêm reduzindo consideravelmente, indicando que as medidas de controle adotadas estão sendo eficazes. Assim, baseando-se na experiência técnica da equipe do SCPrim (ICTB/Fiocruz), este trabalho visa compilar dados teórico-práticos em forma de um manual acerca do processamento de diferentes amostras biológicas, procedimentos de manejo e métodos diagnósticos de TB em criações de PNH, a fim de oferecer subsídios a um plano de contingência para surtos de TB, como orientação técnica de identificação da infecção. Indubitavelmente, o documento contribuirá como uma ferramenta instrutiva para facilitar as ações com mais eficiência e segurança nas tomadas de decisões. O escopo do manual, portanto, consistirá em uma referência aos profissionais que exerçam funções semelhantes em outros criatórios de PNH.

Palavras-chaves: Tuberculose, Primatas não Humanos, Diagnóstico, Manejo Animal, Controle Sanitário.

ABSTRACT

Nonhuman primates (NHP) are highly susceptible to tuberculosis (TB), infection capable of extinguishing animal creations during an outbreak. The scientific breeding of NHP from the Service of NHP Breeding (SCPrim), Institute of Science and Technology in Biomodels (ICTB), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), RJ, maintains a population of around 700 nonhuman primates of the species *Macaca mulatta* ($n = 512$), *M. fascicularis* ($n = 58$), and *Saimiri* sp. ($n = 124$), used for biomedical research. A set of preventive and control measures has been adopted at the referred creation, since the statement of a TB outbreak in 2011. The lack of a standard conduct to deal with the many variables that have arisen as the outbreak reached large proportions, a program based on previous established national and international regulations, which determine the euthanasia of positive animals was defined. Sanitary barriers were implemented, focusing on biosafety, animal management, access control to simian creations, studies on the traceability of TB bacilli in the colonies, collection of biological samples, diversified diagnostic methods, carcass disposal, as well as management of people regarding TB prevention care. The use of a set of control measures were adopted to avoid the pathogen dissemination throw the animal populations. Since 2011 to the present, TB cases have been reduced considerably, indicating that the adoption of control measures are being efficient. Thus, based on the technical experience of the SCPrim (ICTB / Fiocruz) team, this work aims to compile theoretical-practical data in the form of a manual about the processing of different biological samples, management procedures, and diagnostic methods of TB in NHP in order to provide subsidies to a contingency plan for TB outbreaks, as technical guidance for identifying the infection. Undoubtedly, this document will contribute as an instructive tool to facilitate actions with more efficiency and safety in decision making. The scope of the manual will therefore consist of a reference to the professionals that perform similar functions in other NHP creations.

Keywords: Tuberculosis, Nonhuman Primates, Diagnosis, Animal Management, Health Control

LISTA DE FIGURAS

Figura 6.1: Capa do Manual	54
Figura 6.2: Sumário do Manual	55
Figura 6.3: Macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	57
Figura 6.4: Macacos cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	57
Figura 6.5: Macacos-de-cheiro.....	57
Figura 6.6: Recinto dos macacos rhesus.....	58
Figura 6.7: Recinto dos macacos cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>)	58
Figura 6.8: Recinto dos macacos-de-cheiro (<i>Saimiri</i> sp.)	58
Figura 6.9: Demonstração esquemática da patogênese do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb)	59
Figura 6.10: Lesões características de tuberculose em macacos rhesus (<i>M. mulata</i>)	60
Figura 6.11: Vista aérea do campus da Fiocruz e as comunidades que a circundam.....	61
Figura 6.12: Registros de eutanásias dos animais devido a positividade ou suspeitas de TB nas espécies de primatas procedentes do criadouro científico do ICTB- Fiocruz.....	62
Figura 6.13: Abscesso cutâneo na região submandibular em um <i>Saimiri sciureus</i>	63
Figura 6.14: Equipamentos de proteção individual.....	64
Figura 6.15: Equipamentos de proteção coletiva.....	65
Figura 6.16: Profissional paramentado	65
Figura 6.17: Pedilúvio com cal na entrada do recinto dos animais.....	66
Figura 6.18: Desinfecção física do recinto com vassoura de fogo	66
Figura 6.19: Armazenamento de carcaças em freezer antes e após a realização da necropsia.....	67
Figura 6.20: Conjunto de ações de contenção física de macacos rhesus	69

Figura 6.21: Condicionamento para contenção física em macacos rhesus	70
Figura 6.22: Teste tuberculínico em macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	71
Figura 6.23: Coleta de sangue em veia femoral de um macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) posicionado em decúbito dorsal	72
Figura 6.24: Lesões macroscópicas de tuberculose em <i>Saimiri sciureus</i> (A-D) e <i>Macaca mulatta</i> (E-F)	72
Figura 6.25: Esfregação de mucosa oral por meio de swab	73
Figura 6.26: Caixa de transporte de amostras biológicas	74
Figura 6.27: Acondicionamento e identificação de amostras biológicas	75
Figura 6.28: Obtenção de amostras sorológicas para composição do banco de soros (soroteca)	76
Figura 6.29: Crescimento do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb) em meio LJ	76
Figura 6.30: Etapas da realização do teste na plataforma GenExpert®	77
Figura 6.31: Lesões histopatológicas de parênquima pulmonar de macaco rhesus (<i>M. mulatta</i>)	77
Figura 6.32: Fluxo laboratorial para rastreamento do Mtb	78
Figura 6.33: Identificação de TB nos profissionais envolvidos	80
Figura 6.34: Acesso controlado nas colônias de primatas	81
Figura 6.35: Procedimentos de manejo animal para identificação do CMtb	82
Figura 6.36: Leitura do teste tuberculínico de PNH	83
Figura 6.37: Processamento laboratorial de amostras biológicas	84
Figura 6.38: Rastreabilidade do bacilo da TB em uma criação com suspeita de surto	85
Figura 6.39: Rotina dos estudos patológicos para pesquisa de TB	86
Figura 6.40: Descarte de carcaças	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1:	Desinfetantes utilizados em casos de tuberculose bovina	47
Quadro 2.2:	Quantidade de desinfetante a ser utilizada para cada tipo de material a ser desinfetado	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

AFB – *Acid Fast Bacilli*

AG – Aspirado Gástrico

BAAR – Bacilo Álcool Ácido Resistente

BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*

CFP10 – Cultura de Filtrado de Proteína 10

CMtb – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CRPHF – Centro de Referência Professor Hélio Fraga

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELISPOT – *Enzyme-Linked ImmunoSpot-Assay*

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública

EPC – Equipamentos de Proteção Coletiva

EPI – Equipamentos de Proteção Individual

ESAT6 – Alvo Antigênico Secretor Inicial 6

FELASA – *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

GC – Grupo Consultivo

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HUGG – Hospital Universitário Gaffrée e Guinle

ICTB – Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

IFN- γ - Interferon Gama

IL-12 – Interleucina-12

ILTB – Incidência de Infecção Tuberculosa Latente

LBA – Lavado Broncoalveolar

LG – Lavado Gástrico

LJ – Lowensten jansen

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MNT – Micobactéria não Causadora de Tuberculose

MOT – *Mammalian Old Tuberculin*

MPCAL – Mestrado Profissional em Ciências em Animais de Laboratório

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NALC – N-acetil-L-cisteína

NUST – Núcleo de Saúde do Trabalhador

OMS – Organização Mundial de Saúde

OSP – *Oral Swab* PCR

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PGRSS – Programa de Gerenciamento de Resíduos Sólidos em Saúde

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal

PNH – Primatas não Humanos

POP – Procedimento Operacional Padronizado

PPD – *Protein Purified Derivatives*

RD1 – Região de Diferença-1

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIF – Rifampicina

SCPrim – Serviço de Criação de Primatas não Humanos

SIM – Sistema de Informações sobre Mortalidade

Sinan – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SITE-TB – Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose

SIV – Simian Immunodeficiency Virus

SUS – Sistema Único de Saúde

TB – Tuberculose

TBb – Tuberculose Bovina

TBEP – Tuberculose Extrapulmonar

TBL – Tuberculose Latente

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRAs – Tecnologias de Reprodução Assistida

T-SPOT-TB – Teste “Spot” de Tuberculose

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

WHO – *World Health Organization*

ZN – Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Breve histórico da tuberculose.....	22
2.2. Etiologia e patogênese.....	23
2.3. Epidemiologia da tuberculose.....	25
2.3.1. A tuberculose no Brasil.....	27
2.3.2. A tuberculose no Rio de Janeiro/RJ.....	28
2.4. Caráter zoonótico da tuberculose.....	28
2.4.1. A tuberculose em primatas não humanos.....	30
2.5. Manifestação clínica da tuberculose em primatas não humanos.....	31
2.5.1. Manifestação clínica da tuberculose na infecção latente.....	31
2.5.2. Manifestação clínica da tuberculose ativa na infecção primária.....	32
2.6. Diagnóstico da tuberculose.....	32
2.6.1. Bacteriológicos.....	32
2.6.2. Imunológicos.....	33
2.6.2.1. Teste tuberculínico.....	33
2.6.2.2. Interferon gama (INF- γ).....	35
2.6.3. Moleculares.....	36
2.6.3.1. Reação em cadeia da polimerase (IS6110).....	37
2.6.3.2. GeneXpert [®] MTb/RIF.....	36
2.6.4. Anátomo-patológicos.....	39
2.7. Controle e erradicação da tuberculose em criação de primatas não humanos.....	41
2.7.1. Rastreabilidade do bacilo.....	41
2.7.2. Manejo com primatas não humanos.....	42
2.7.3. Medidas profiláticas.....	44
3. JUSTIFICATIVA.....	48
4. OBJETIVOS.....	50

4.1. Objetivo geral.....	50
4.2. Objetivos específicos.....	50
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
5.1. Pesquisa documental.....	51
5.2. Elaboração de fluxos de monitoramento do bacilo da tuberculose	52
5.3. Elaboração do manual técnico.....	53
5.4. Preparo para a elaboração de procedimentos operacionais padronizados (POPs).....	53
6. RESULTADOS.....	54
6.1. Capítulo 1: Primatas não Humanos e surto de tuberculose na esfera da Fiocruz.....	56
6.2. Capítulo 2: Tuberculose em primatas não humanos.....	59
6.3. Capítulo 3: Medicina preventiva de primatas de cativeiro.....	63
6.4. Capítulo 4: Manejo com primatas não humanos.....	68
6.5. Capítulo 5: Coleta e manipulação de amostras biológicas para diagnóstico de tuberculose.....	71
6.6. Capítulo 6: Fluxos de rastreabilidade do bacilo da tuberculose em criações de primatas não humanos.....	78
6.7. Capítulo 7: Perspectivas e desafios: é possível garantir proteção a criações de primatas quando o bacilo da tuberculose representa ameaça contínua.....	88
6.8. Considerações finais.....	88
7. DISCUSSÃO.....	89
8. CONCLUSÃO.....	92
9. REFERÊNCIAS.....	93
10. ANEXO	101
10.1. Anexo A: Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA	101

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma zoonose causada pelos bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb). A enfermidade é de relevância para a saúde pública, causando casos em humanos e animais no mundo inclusive no Brasil (SUZUKI; MATSUBA; NAKAJIMA, 2010).

Os PNH mantidos em cativeiros provenientes de zoológicos, criatórios comerciais, institutos de pesquisa e centros de triagem, podem ser infectados mais facilmente devido às variadas vias de transmissão. Além da inalação de partículas de aerossóis contaminados, outros meios de transmissão importantes devem ser considerados como, por exemplo, ingestão de água e alimentos contaminados, agressões entre os animais alojados no mesmo recinto, de forma acidental por meio de procedimentos médicos, tatuagem ou intubação gástrica e até mesmo, por contato com humanos, principalmente após o processo de capturas, sendo, por conseguinte, rapidamente disseminada no ambiente (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; VERVENNE et al., 2004; BAKKER, 2008; MUGISHA, UNWIN; LANGHOUT, 2009).

Os PNH são filogeneticamente próximos dos seres humanos, motivo pelo qual muitas zoonoses que acometem ambas as espécies são identificadas, o que inclui a TB. Há relatos de contaminação por bacilos do CMtb em colônias de criação de PNH de vários lugares do mundo, manifestando, na maioria dos animais, um quadro assintomático, fato que dificulta a avaliação clínica. Com isso, é recomendado adotar medidas profiláticas e associar métodos de diagnósticos em casos de surtos (ROBERTS; ANDREWS, 2008).

Surtos de TB são frequentemente relatados em criações de PNH com elevadas morbidade e mortalidade, representando grande ameaça aos planteis (BAKKER, 2008; VERVENNE et al., 2004). Por se tratar de um dos agravos mais importantes em PNH (PASA, 2009), existem vários estudos voltados para seus

aspectos patológicos em animais cativos (ABRAHÃO, 1998). Em criações de primatas procedentes de instituições de pesquisa, torna-se imperioso estabelecer protocolos bem definidos para o monitoramento sanitário no que se refere à identificação de indivíduos infectados, a fim de evitar a propagação do bacilo na população animal e, assim, prevenir um surto (ANDRADE, 2017).

Atualmente não existe um protocolo nacional definido para controle e erradicação de TB específico para PNH. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) possui o único programa direcionado a TB em bovídeos, que recomenda a eutanásia de animais suspeitos ou com resultados positivos em testes tuberculínicos e realização do teste de 2/2 meses em caso de surto, com a possibilidade de isolamento animal para diagnóstico complementar. A Resolução Normativa Nº 28, de 13 de novembro de 2015, orienta sobre a manutenção, criação e experimentação de PNH em instalações de instituições de ensino e pesquisa científica (BRASIL, 2016a), porém não traz um enfoque específico voltado para TB. Existem, no entanto, protocolos internacionais específicos para criações de primatas, como as recomendações da *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA, 1999) e o guia europeu de prevenção e controle de TB em PNH (BUSHMITZ et al., 2009).

O Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, possui um criadouro científico de cerca de 700 PNH de quatro espécies símias, sendo 512 macacos rhesus (*Macaca mulatta*), 58 macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e 130 macacos-de-cheiro (124 *Saimiri sciureus* e seis *Saimiri ustus*). O objetivo principal da manutenção e criação destas colônias é fornecer animais para uso em pesquisa biomédica, especialmente pesquisas relacionadas a testes de drogas e vacinas contra doenças infecciosas tropicais, como a leishmaniose, doença de Chagas, malária, hepatite viral, dengue, febre amarela e vírus zika. As referidas criações são antigas e, também, consideradas um patrimônio histórico valioso para a instituição (ANDRADE et al., 2004; ANDRADE et al, 2010).

Em 2011 foi identificado um surto de TB por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) nas criações de PNH do ICTB. Em virtude do elevado valor agregado dos animais, critérios éticos e a limitação dos testes diagnósticos na certificação de animais livres de TB, tornou-se premente a realização de um amplo estudo para a compreensão das características da infecção e da doença nas espécies de primatas

para uso em pesquisa e desenvolvimento em saúde. Inúmeras ações foram aplicadas na busca do controle e erradicação deste bacilo, que resultou na ideia da elaboração de um manual sobre procedimentos de manejo e diagnóstico de TB em PNH mantidos em cativeiro (ANDRADE et al, 2010).

Desta forma, baseando-se na experiência técnica da equipe do Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim) do ICTB/Fiocruz, este trabalho visa compilar dados teórico-práticos acerca do processamento de diferentes amostras biológicas, procedimentos de manejo e métodos diagnósticos de TB em criações de PNH. O trabalho, assim, oferece subsídios a um plano de contingência para surtos de TB, como orientação técnica de identificação da infecção, com o objetivo final de elaborar um manual que possa servir de ferramenta instrutiva que facilite as ações com mais eficiência e segurança nas tomadas de decisões. O escopo do manual, portanto, consistirá em uma referência aos profissionais que exerçam funções semelhantes em outros criatórios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve histórico da tuberculose

Uma das personalidades mais representativas na história da TB é o bacteriologista alemão Heinrich Hermann Robert Koch (1843-1910). Formado em Medicina e Química, foi primordial em pesquisas voltadas a Microbiologia. Em 1882, Koch realizou um experimento, onde cultivou micro-organismos *in vitro* e introduziu *in loco* no pulmão de animais, principalmente em ratos, cobaias, coelhos e em primatas não humanos. Os resultados demonstraram a transmissão da infecção ao animal e determinou seu primeiro postulado quanto às exigências que julgava necessárias para a demonstração da etiologia bacteriana de qualquer doença: isolar o micro-organismo em culturas puras inoculá-lo em animais de laboratório e produzir a doença cujos sinais clínicos e lesões fossem idênticas ou equiparáveis aos da doença "típica" no homem (SAKULA, 1983).

Tal conhecimento foi o ponto de partida para o estudo do bacilo, conhecido, a partir daí, também por "bacilo de Koch". Sucessivas pesquisas realizadas levaram à descoberta do método de Ziehl-Neelsen (ZN), para evidenciar o *Mycobacterium*. Permitindo visualizar o bacilo hoje conhecido como bacilo álcool ácido resistente (BAAR) (*AFB-acid fast bacilli*). Isso propiciou sua melhor visualização ao microscópio, tendo sido instituída a baciloscopia nos estudos patológicos da TB aplicada como rotina nos laboratórios até os dias atuais (SAKULA, 1983; FLYNN et al., 2003).

Na década de 1890, Koch iniciou os estudos para desenvolver a tuberculina, extrato de proteína composto por uma mistura de antígenos presentes no bacilo obtido por meio de cultura microbiológica. Verificou-se, portanto, que a tuberculina tinha valor como ferramenta de diagnóstico para distinguir os infectados dos não infectados. A descoberta da tuberculina e o seu emprego no diagnóstico da infecção tuberculosa tem suas origens nas ideias de Louis Pasteur, relacionadas às práticas higiênicas. Este foi o início da revolução biomédica com introdução da medicina em termos de cirurgia, higiene, legislação, ensino e saúde pública (SAKULA, 1983; CARRERO, 1998).

A descoberta do bacilo da TB e da tuberculina revolucionou a conduta de controle da doença, promoveu contribuições à bacteriologia, colocando Koch entre os médicos imortais na Academia de Medicina mundial (SAKULA, 1983).

2.2. Etiologia e patogênese

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales*, sub-ordem *Corynebacterineae*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium*. O gênero *Mycobacterium* compreende 191 espécies (EUZEBY, 2018). Entre estas há um grupo capaz de infectar seres humanos e outros mamíferos, incluído no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb), ao qual fazem parte as espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. canettii*, *M. mungi*, *M. ori* e *M. caprae* (DE SOUZA FIGUEIREDO et al., 2008; CAMPOS, 2006). A TB é uma doença infectocontagiosa granulomatosa crônica, sendo o Mtb o principal agente etiológico nos seres humanos. Porém, há relatos de contaminação pelo *Mycobacterium bovis*, responsável pela tuberculose bovina (TBb), sendo este agente considerado um grande problema mundial de saúde para humanos e animais (ALVES DA SILVA, 2014).

A variedade de manifestações patológicas observada nos macacos é semelhante à dos seres humanos. Os granulomas tuberculosos são compostos principalmente por macrófagos e linfócitos, apresenta um centro caseoso clássico observado predominantemente nos pulmões. Entretanto, outros tipos de granulomas pulmonares em macacos incluem os não necrosantes, as lesões fibróticas ou calcificadas, bem como pneumonia de TB, cavidades e fibrose intersticial, observadas apenas em animais com TB ativa. Em PNH é provável que o tipo de granuloma seja um dos fatores determinantes para a progressão da doença, reativação da infecção latente e resposta ao tratamento medicamentoso (HENRICH et al., 2007).

Ao acessar o organismo do indivíduo pelas vias aéreas, os bacilos são capturados pelas células do sistema imune inato, incluindo macrófagos alveolares e células dendríticas. Para que a infecção seja estabelecida, o bacilo dentro do macrófago alveolar começa a se replicar, provocando uma resposta inflamatória lenta que recruta mais macrófagos e outras células inatas. Este é o início da

formação de um granuloma, embora sejam necessárias respostas adaptativas para a sua completa definição (BLISCHAK et al., 2015)

O granuloma associado ao linfonodo forma o complexo Ghon clássico (FLYNN et al., 2015). Em PNH são observados linfonodos mediastinais, proeminentes nos linfonodos hilares torácicos e nos lóbulos pulmonares. Os linfonodos torácicos podem ser uma fonte rica de células T específicas contra *Mtb*. Durante o início da infecção o número de células T específicas, que produzem IFN- γ , é substancialmente maior nos linfonodos torácicos, quando comparados com os granulomas dos pulmões. No entanto, as células T ativadas também são encontradas nos linfonodos torácicos de animais com TB disseminada e latente (FLYNN et al., 2015; BLISCHAK et al., 2015).

Evidências apontam que as lesões granulomatosas *in vivo*, ao longo da infecção em PNH, parecem destacar áreas de inflamação associadas a neutrófilos, macrófagos ou linfócitos e que pode apresentar tamanho e orientação espacial com variações, característica que revela sua trajetória ao longo da infecção, incluindo a identificação de granulomas recém-formados durante a infecção primária e reativação da TB; porém, diferem em sua evolução entre animais com TB ativa e infecção latente. Assim, é a atividade de soma total da carga de granuloma de um indivíduo que, em última análise, contribui para o desfecho clínico (FLYNN et al., 2003; FLYNN et al., 2015).

Em PNH e humanos, a formação de granulomas e o aumento do nódulo linfático mediastinal ocorrem durante o curso da infecção, variando de acordo com o estado imunológico do infectado. A infecção dos linfonodos por *Mtb* pode contribuir para o agravamento da doença e patologia em PNH, quando se tornam aumentados e necróticos, resultando em colapso e enfisema pulmonar. Os macacos rhesus, em geral, têm maior número de gânglios linfáticos infectados e menor de necrosados, assemelhando-se à situação da TB pediátrica. Já os macacos *cynomolgus* podem representar a situação da TB em humanos adultos, com infecção latente quase sempre apresentando granuloma pulmonar, muitas vezes calcificado, e em outros casos, no complexo de Ghon (CHOI et al., 2016).

Além do IFN- γ , outras citocinas importantes estão envolvidas na resposta imune ao *M. tuberculosis*, o que incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNF), e a interleucina-12 (IL-12). A produção de IFN- γ desempenha um papel importante na resposta imune, necessária para o controle da infecção. O TNF ativa macrófagos e

provoca a morte intracelular da bactéria, além de ter um papel importante na formação e manutenção do granuloma. As células TCD4 são responsáveis pela produção de IFN- γ para auxiliar a ativação de macrófagos, bem como outras funções efetoras envolvidas na eliminação da bactéria. As células TCD8 também estão envolvidas no mecanismo de morte das células infectadas via secreção de granulolisina. As células B são responsáveis pela produção de anticorpos, podem desempenhar um papel na apresentação de antígenos e estão presentes nas estruturas do granuloma (LIN et al., 2008).

Um fator que interfere na resposta imune contra a TB em PNH é a infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV). A infecção latente pelo SIV em macacos cynomolgus resulta em aumento significativo da frequência de células T específicas por um curto período, seguido da sua reativação. O andamento da reativação viral dependente de reduções prematuras nos números de células T periféricas CD4+, sugere uma correlação com o aumento da replicação bacteriana em granulomas exauridos em função de constantes respostas no combate ao bacilo pelas células T. Na maioria dos casos, os granulomas dos PNH SIV-positivos são semelhantes aos SIV-negativos (FLYNN et al., 2003; FLYNN et al., 2015).

Sendo assim, os granulomas são dinâmicos com fenótipos das populações de macrófagos susceptíveis de sofrerem mudanças significativas ao longo da infecção, o que pode desencadear uma resposta imune eficiente no combate ao bacilo ou ineficiente, resultando na doença ativa (PHUAH et al., 2012).

2.3. Epidemiologia da tuberculose

A TB é uma enfermidade que acomete milhares de pessoas no mundo e estima-se que um terço da população mundial alberga em seu organismo o bacilo de Koch, e dessas, apenas 5% desenvolvem TB ativa (ROSEMBERG, 2001). Consiste em uma das 10 principais causas de morte em todo o mundo. Em 2015, havia cerca de 10,4 milhões de novos casos de TB em todo o mundo, sendo 1,2 milhão (11%) representado por pessoas que vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em 2016, assumiu o primeiro lugar entre as doenças infecciosas que mais matam, ultrapassando o HIV (WHO, 2016).

Atualmente a TB tem destaque em decorrência do problema exacerbado nos últimos anos pela pandemia do HIV e pelo surgimento de resistência a múltiplos antibióticos com evolução para uma doença multirresistente, notadamente em associação com este vírus (ZUMLA et al., 1999).

É um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Seis países representaram 60% dos novos casos: Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul. Em todo o mundo, a taxa de declínio na incidência de TB permaneceu em apenas 1,5% de 2014 a 2015 (WHO, 2016). Em regiões onde a urbanização é cada vez mais acelerada e desordenada a incidência aumenta o que promove a rápida transmissão da doença (HIJJAR; OLIVEIRA; M. TEIXEIRA, 2001).

2.3.1. A tuberculose no Brasil

O Brasil é um dos 22 países responsáveis por concentrar 80% da carga mundial de TB, sendo as ações de combate à doença priorizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Em 2014, durante a Assembleia Mundial de Saúde, ocorreu aprovação de uma nova estratégia global para enfrentamento da doença, com metas para reduzir os casos de TB ou mesmo erradicar até o ano de 2035. A partir disso, o Ministério da Saúde iniciou a construção de um plano nacional com indicadores operacionais e epidemiológicos como os eixos principais dos programas de controle da TB (BRASIL, 2017).

Os dados são obtidos a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), do Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose (SITE-TB) e do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Análises realizadas no período entre 2006 a 2016 para os indicadores epidemiológicos e entre 2015 e 2016 para os indicadores operacionais demonstraram que em 2016 foram diagnosticados e registrados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento de TB no Brasil (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2017).

No período entre 2007 a 2016, o coeficiente de incidência da doença apresentou uma variação média anual de -1,7%, passando de 37,9/100 mil habitantes em 2007 para 32,4/100 mil habitantes em 2016. Apesar dessa redução, a meta para eliminação da TB como problema de saúde pública no Brasil é de <10 casos para cada 100 mil habitantes, ou seja, 85% dos novos casos de pacientes

bacilíferos, resultado este que está condicionado a alguns indicadores, como por exemplo, a redução do coeficiente de incidência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS (BRASIL, 2016a).

O país segue com o plano nacional pelo fim da TB, definindo indicadores para o monitoramento do progresso das ações empregadas na prevenção e no cuidado integrado centrados no paciente, políticas arrojadas e sistema de apoio, bem como na intensificação da pesquisa e inovação (BRASIL, 2017).

2.3.2. A tuberculose no Rio de Janeiro/RJ

O estado do Rio de Janeiro é endêmico para TB e, especialmente as comunidades e periferias da cidade sofrem com essa doença. Com uma população de cerca de sete milhões de habitantes, mais de dois milhões vivem nas 763 comunidades existentes na cidade. De acordo com o Censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o RJ é a cidade brasileira que possui o maior percentual de sua população vivendo em assentamentos informais (22%), fato que viabiliza elevados índices de mortalidade por TB (IBGE, 2010).

A questão implica em uma relação intrínseca entre a apropriação desigual do espaço urbano e a incidência de TB, considerando que o grande adensamento populacional, a baixa qualidade das habitações e o acesso insuficiente a serviços essenciais facilitam a reprodução social da doença (IBGE, 2010).

2.4. Caráter zoonótico da tuberculose

A infecção pode ocorrer em diversas espécies de mamíferos, associadas ao seu próprio tipo de hospedeiro humano e não humano, tais como ungulados e roedores (BAKKER, 2008; WILBUR; ENGEL; JONES-ENGEL, 2012). Em função da característica zoonótica, a TB gera preocupação em relação ao bem-estar e a saúde animal, assim como para a saúde humana, visto que causa uma doença pulmonar progressiva, principalmente em PNH. A TB clínica só é evidente uma vez que a infecção está bem desenvolvida, o que oferece um tempo mais que suficiente para a doença se disseminar (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; VERVENNE et al., 2004).

Há relatos de contaminação por bacilos do CMtb em PNH mantidos em criadouros científicos e jardins zoológicos em diversos lugares do mundo, especialmente quando animais importados de países com alta prevalência de infecção humana são introduzidos nestas criações, impulsionando, assim, os estudos da TB em animais cativos exóticos (ABRAHÃO, 1998).

A infecção por micobactéria em PNH pode resultar em manifestações pulmonares semelhantes às observadas em humanos, incluindo lesões granulomatosas caseosas e cavitárias, que facilitam a disseminação do bacilo por aerossóis infectados para outros animais ou seus manipuladores. Evidências sugerem que os PNH do Velho Mundo podem manter infecção latente tal qual no humano (ABRAHÃO, 1998).

Um surto foi documentado em uma colônia fechada de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) do Instituto de Pesquisa de Ciências Médicas - *Research Institute of Medical Sciences*, em Bangkok/Tailândia mesmo com rigor na biossegurança dessa instituição. Realizada a triagem do bacilo na colônia; porém, o estudo não foi conclusivo quanto à fonte da infecção. Todavia, sugeriu que os homens que trabalham direta ou indiretamente com os animais poderiam apresentar uma infecção latente não diagnosticada e, assim, podem ter disseminado o bacilo via aerossóis ou escarro contaminado, o que deflagrou surtos intermitentes no referido criatório (PAYNE et al., 2011).

Outro estudo realizado em 68 PNH mantidos no zoológico de Cali e nos tratadores dos animais, utilizando métodos de diagnósticos bacteriológicos e moleculares, identificou a presença de *Mycobacterium* em 13 diferentes espécies de primatas do Novo Mundo. Não houve correlação entre a presença de Mtb nos PNH estudados e a TB em pessoas que cuidam dos animais; entretanto, considerando que o teste PPD não está atualmente incluído nos regulamentos colombianos relativos à conduta médica anual, é possível supor que os cuidadores que trabalham neste zoológico podem ter constituído uma potencial fonte de infecção. Isto porque a incidência de TB humana nas regiões onde os macacos foram capturados é um dos mais altos na Colômbia, sugerindo que esses animais poderiam ter contraído a infecção por meio de contato com pessoas com tuberculose (ALFONSO et al., 2004).

Em razão da TB ser uma das antropozoonoses de relevância para a saúde pública, torna-se necessário que a vigilância em zoonoses desenvolva e execute

ações que assegurem a prevenção e/ou combate, no que diz respeito à instalação, transmissão e manutenção desta epizootia, considerando a população exposta, a espécie animal envolvida e a área afetada (alvo) em um determinado espaço de tempo (BRASIL, 2016b).

Considerando também a potencial ameaça que a TB animal representa à saúde pública, torna-se imperioso promover ações no sentido de conscientizar a população a respeito do caráter zoonótico desta insidiosa doença. O desconhecimento das comunidades assistidas acerca dos riscos da TB zoonótica demonstra a necessidade de uma maior interação da comunidade científica e das instituições governamentais com a sociedade, visando à conscientização sobre a importância da adoção de práticas sanitárias adequadas, no sentido de contribuir para o controle e/ou erradicação da doença e minimizar as implicações na saúde (BRASIL, 2011).

2.4.1. A tuberculose em primatas não humanos

No tocante aos aspectos epidemiológicos da TB em PNH, desde a década de 1970 há evidência de reduções significativas na incidência da doença. Todavia, surtos de TB continuam a ocorrer em colônias estabelecidas e permanecem ameaçando a saúde destes animais e dos trabalhadores (LERCHE et al., 2008). No entanto, apesar das diretrizes estabelecidas pelos Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em 1991 e da ampla adoção de programas de vigilância, praticamente todas as instalações de primatas, principalmente, nos Estados Unidos já apresentaram casos de TB (KAUFMANN, 1971; BUTLER; HAAS; CRAWFORD, 1996; ROBERTS; ANDREWS, 2008).

Em geral, a TB é menos frequente em espécies de primatas originárias da África e pouco comum em espécies da América do Sul. Todavia é mais insidiosa em animais originários de países da Ásia, particularmente os animais do subcontinente indiano. De qualquer modo, espécies símias de diferentes áreas geográficas não devem ser alocadas em um mesmo ambiente, uma vez que podem resultar em disseminação generalizada da doença (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001).

Animais assintomáticos podem estar sujeitos à reativação de infecções latentes e quando não detectadas, especialmente durante a quarentena, é um fator

de risco na epidemiologia da TB em PNH. Estas são as principais razões pelas quais essa doença é tão difícil de ser controlada em PNH (MUGISHA, UNWIN; LANGHOUT, 2009).

2.5. Manifestação clínica da tuberculose em primatas não humanos

Macacos rhesus e cynomolgus podem apresentar um espectro clínico da doença semelhante ao do humano com manifestações variando de TB latente à ativa e índices de mortalidade significantes (WILBUR; ENGEL; JONES-ENGEL, 2012). Além das similaridades imunológicas, a variedade de resultados decorrentes da infecção, apresentação clínica e patológica nestes macacos pode ser notavelmente similar à TB humana (FLYNN et al., 2015). Os macacos rhesus exibem um curso clínico variável, enquanto os macacos cynomolgus tendem a um curso de infecção crônico (MUGISHA, UNWIN; LANGHOUT, 2009). Ainda assim, pouco se entende sobre os fatores que influenciam a patogenicidade do Mtb em PNH e a literatura sobre a progressão da infecção em outras espécies de primatas é escassa (WILBUR; ENGEL; JONES-ENGEL, 2012).

2.5.1. Manifestação clínica da tuberculose na infecção latente

Os PNH invariavelmente vão a óbito sem que haja história clínica ou sinais clínicos relevantes, tendo sido observado com maior frequência o desenvolvimento de sinais respiratórios nos macacos rhesus do que nos cynomolgus (CHOI et al., 2016). A infecção latente é evidenciada pelos testes tuberculínicos positivos e parâmetros imunológicos específicos de infecção por Mtb, com resultado negativo para cultura em aspirado gástrico (AG) ou lavado broncoalveolar (LBA), além da sedimentação de eritrócitos (velocidade de sedimentação - VHS) normal dois meses após a infecção. O espectro de infecção latente em seres humanos, especialmente em pessoas infectadas pelo HIV, e os macacos cynomolgus são semelhantes, onde a doença subclínica é detectada por meio de um teste de liberação de interferon- γ positivo (IGRA - *Interferon Gamma Release Assay*) ou testes tuberculínicos positivos, radiografia de tórax normal, mas com baciloscopia positiva (FLYNN et al., 2015).

2.5.2. Manifestação clínica da tuberculose ativa na infecção primária

Assim como nos humanos, a TB ativa em PNH apresenta alguns sinais de doença, como: tosse, fraqueza, paralisia, perda de apetite, alopecia, depressão profunda e perda de peso, sendo a caquexia um forte indicativo de TB em PNH. (FLYNN et al., 2015; MÄTZ-RENSING et al; 2015).

Em macacos rhesus, a TB normalmente se manifesta de forma aguda e progressiva, desencadeando a lesão pulmonar, com pontos de abscessos localizados. Casos de TB cutânea primária e secundária são caracterizados por feridas não cicatrizantes, úlceras drenantes ou traços fistulosos combinados com o aumento dos linfonodos (MÄTZ-RENSING; et al 2015). Embora existam poucos relatos de TB em primatas do Novo Mundo, eles são suscetíveis à infecção por micobactérias mediante exposição. É imperioso que as espécies do Velho e do Novo Mundo sejam alojadas separadamente (LEATHERS; HAMM,1976).

2.6. Diagnóstico da tuberculose

Por ser uma doença infectocontagiosa, a confirmação diagnóstica é dada pela detecção do bacilo ou resposta imune ao antígeno da TB no indivíduo. Atualmente são utilizados métodos diagnósticos bacteriológicos, imunológicos, moleculares e histopatológicos. A escolha do tipo de exame a ser empregado é essencial para auxiliar na tomada de decisões das medidas cabíveis quanto à intervenção da cadeia de transmissão do bacilo da TB. Uma vez que a patogênese, a susceptibilidade e as respostas imunes variam amplamente quando se trata de animais cativos ou silvestres, um mesmo teste de diagnóstico pode ser mais eficiente para os cativos e menos eficiente para os silvestres ou vice-versa; por isso, é recomendado aplicação de pelo menos dois métodos, na tentativa de minimizar resultados falso-negativos e aumentar as chances de detecção de animais infectados (CAMPOS, 2006; LÉCU; BALL, 2011).

2.6.1. Bacteriológicos

A cultura e a baciloscopia do bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR) associadas são consideradas os “métodos de eleição” para o diagnóstico da TB. A

baciloscopia feita pela coloração de ZN é atualmente a técnica mais utilizada no Brasil, não apenas para o diagnóstico, como também para o controle do tratamento. Desde que executada corretamente, permite detectar de 60% a 80% dos casos, com resultado em até 24 horas. Em 2012, dos 59.972 casos de TB pulmonar registrados no país, 85,8% realizaram baciloscopia no momento do diagnóstico da TB; desses, 37.907 (73,7%) tiveram o resultado positivo. Este método é fundamental, do ponto de vista epidemiológico, já que os casos bacilíferos são os responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão. A técnica da coloração de ZN é de processamento rápido, sendo a análise um procedimento relativamente simples. Contudo, não é específica para a identificação do CMtb (WHO, 2011; BRASIL, 2011).

A cultura é uma técnica considerada “padrão-ouro”, sendo possível utilizar amostras de LG, LBA ou retal, fezes, biopsia de fragmentos de órgãos com ou sem lesão macroscópica. O grande problema é que é necessário um período de até dois meses para obtenção do resultado final (BUSHMITZ et al., 2009). Todavia, a cultura associada aos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, permite o diagnóstico dos casos de Mtb resistente a drogas (BRASIL, 2006).

Para detectar bacilos de TB pela coloração de ZN em amostras de PNH são necessárias cargas de bacilos superiores a 10^3 - 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) de Mtb por mL, porém menos de 10 UFC/mL são suficientes para infectar um macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Isso significa que uma amostra pode apresentar resultado positivo na cultura e negativo na baciloscopia. Portanto, uma cultura positiva fornece evidência de doença, entretanto uma cultura negativa não exclui a possibilidade dos animais estarem infectados com TB. Em razão da baixa carga bacteriana no estágio inicial da doença, animais com resultados positivos no teste tuberculínico podem apresentar resultados negativos na cultura, não excluindo a possibilidade de contaminação (LÉCU; BALL, 2011).

2.6.2. Imunológicos

2.6.2.1. Teste tuberculínico

O teste tuberculínico tem sido o mais utilizado para a detecção da infecção da TB em humanos e em PNH. Consiste na administração intradérmica de

tuberculina. A leitura é feita em 24, 48 e 72 horas após a inoculação por meio da detecção de uma resposta de hipersensibilidade tardia, caracterizada por um edema cutâneo local (ANDERSEN et al., 2000; JANEWAY; TRAVERS; WALPORT, 2001).

Para PNH de porte médio (de 4 a 7 kg) e grande porte (> 7 kg) recomenda-se 0,1 mL de tuberculina de mamíferos (Mammalian Old Tuberculin/MOT, 2.500 UI) e 0,05 mL para PNH de pequeno porte (< 4 kg) (BRASIL, 2016b). A aplicação é realizada na margem superior côncava da pálpebra, local de eleição para administrar o teste por ser de fácil leitura. No caso de trauma no olho recomendado, aplica-se na pálpebra do olho esquerdo. No caso de trauma ocular bilateral, pode-se administrar o inóculo na região periumbilical (BUSHMITZ et al., 2009).

Apesar de estabelecido internacionalmente como teste padrão de triagem de TB, o teste tuberculínico possui algumas limitações para os PNH, que podem gerar resultados falso-positivos em função das reações cruzadas com outras micobactérias não patogênicas. Resultados falso-negativos são gerados em consequência de a: i) falta de especificidade dos antígenos do CMtb; ii) ausência de reação alérgica (anergia), que pode ocorrer em períodos próximos ao parto (15 dias antes ou após); iii) animais imunodeprimidos e desnutridos; iv) animais infectados a menos de 40 dias da aplicação; v) inoculações sucessivas; vi) aplicação de altas doses de antígeno. Em PNH é preciso uma maior concentração dos antígenos para induzir uma reação positiva ao teste tuberculínico em comparação com os seres humanos. Deste modo, para se evitar as reações falsas, tanto positivas como negativas do PPD, outros métodos foram desenvolvidos para diagnóstico da infecção, tanto para humanos como para PNH (FINKELSTEIN; HOPKINS, 1996; LEINER; MAYS, 1996; AREND, 2001; AREND et al., 2001).

Os resultados falso-positivos em animais sensibilizados para outras micobactérias ambientais e as sucessivas interrupções do processo de produção comercial da MOT, único fabricante nos Estados Unidos (Synbiotics, Inc.), desde a década de 1990 até os dias atuais, acarretou uma suspensão da vigilância rotineira da TB em muitas instalações de PNH e de quarentena primária, no caso de importação. Esse cenário tem sido o principal motivador nos esforços constantes para desenvolver e validar métodos adicionais na vigilância da TB em PNH (LERCHE et al., 2008).

2.6.2.2. Interferon gama (IFN- γ)

Técnicas alternativas têm sido aperfeiçoadas na busca de um diagnóstico preciso para TB. Um desses métodos baseia-se na detecção do IFN- γ , citocina liberada por células T quando entram em contato com antígeno específico de *Mycobacterium*, desencadeando uma resposta imune à TB no hospedeiro. Imediatamente após a infecção, a resposta imune celular é predominante, responsável pela formação dos granulomas característicos da doença. Nessa fase, a população bacteriana ainda é pequena. Na segunda fase da infecção, a resposta imune é dominada pela formação de anticorpos circulantes, correlacionada a uma severa progressão da doença e com o aumento significativo da população micobacteriana e, conseqüentemente, à sensibilidade ao teste (LIN et al., 2008; BAKKER, 2008).

Os ensaios com IFN- γ , portanto, atualmente são métodos *in vitro* adotados como alternativa ao teste tuberculínico, utilizados para humanos e PNH. Os ensaios com IF- γ são mais específicos, uma vez que as proteínas ESAT6 e o CFP10 utilizadas nos kits são exclusivas ao grupo do CMtb, o que diminui a probabilidade de resultado falso-positivo (PAI; RILEY; COLFORD JR, 2004).

Atualmente, o Quantiferon-TB[®] (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Austrália) e o T SPOT-TB[®] (Oxford Immunotec, Oxford, Reino Unido) são os dois ensaios comerciais baseados na imunidade mediada por células T com a liberação de IFN- γ em resposta aos antígenos de Mtb, ambos utilizam métodos como o ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) e o ensaio imunoSpot ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunospot-assay*- ELISPOT). A primeira geração utilizou amostras de sangue total e o ensaio ELISA para aferir o IFN- γ liberado em resposta ao PPD. O outro teste é o T SPOT-TB cuja produção de IFN- γ é feita por meio do ensaio ELISPOT utilizando-se células mononucleares de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMCs), que quando incubadas com as proteínas ESAT6 e CFP10, produzem a citocina em resposta aos antígenos de *Mycobacterium* (VERVENNE et al., 2004; PAI; RILEY; COLFORD JR, 2004; AMORIM, 2015).

O PRIMAGAM[®] é um teste rápido de quantificação de IFN- γ , validado para as espécies *Macaca fascicularis* e *M. mulatta*, considerado como ferramenta importante na vigilância da TB em criações de PNH (GARCIA et al., 2004; VERVENNE et al., 2004; AMORIM, 2015).

Por fim, os testes tuberculínicos e os de IFN- γ são hoje mundialmente aceitos como métodos para a triagem de TB em PNH. O IFN- γ , particularmente aqueles produzidos em resposta a antígenos RD1, são importantes como um diagnóstico de referência nas elucidações clínicas. Tanto para humanos quanto para PNH, a maior especificidade destes ensaios consiste em uma alternativa para o monitoramento da TB nos casos de teste tuberculínicos positivos (PAI; RILEY; COLFORD JR, 2004; LIN et al., 2008).

2.6.3. Moleculares

Os diagnósticos moleculares têm sido cada vez mais adotados na detecção do CMtb por promoverem novas possibilidades para investigar os efeitos deste patógeno mal compreendido em PNH. Além disso, a biologia molecular é capaz de gerar resultados fidedignos em um curto espaço de tempo (WILBUR et al., 2012). Os avanços no sequenciamento genético de Mtb e *M. bovis* permitiram a identificação de proteínas específicas do CMtb, como ESAT-6 e CPF-10 (LERCHE et al., 2008).

As vantagens dos métodos moleculares são que, em geral, não dependem da função imune intacta de um hospedeiro específico, permite monitorar a transmissão, definir determinados grupamentos populacionais de cepas, diferenciar a reinfecção endógena da exógena, avaliar recidiva, identificar contaminação cruzada em laboratórios, estudar a evolução molecular das espécies e compreender melhor a patogênese da doença (ABRAHÃO, 1998; CAMPOS, 2006). Outra vantagem é o seu potencial para informar a análise genotípica e filogenética, aproveitando os recentes estudos do genoma e a crescente coleção de sequências de genes expostas no GenBank que possibilita a definição dos padrões de transmissão do CMtb, dados essenciais para prevenir uma infecção na colônia (WILBUR; ENGEL; JONES-ENGEL, 2012).

2.6.3.1. Reação em cadeia da polimerase (IS6110)

Consiste em um tipo de amplificação por reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR) que amplificam o fragmento de 123 pb da sequência IS6110, exclusivo do CMtb (WILBUR; ENGEL; JONES-ENGEL, 2012).

Apoiado no princípio de que as micobactérias são patógenos intracelulares predominantemente respiratórios ou gastrointestinais, amostras de LBA e AG podem aumentar a probabilidade de identificar um animal infectado. A técnica de PCR IS6110 foi utilizada para detecção de DNA de bactérias do CMtb em amostras de cavidades bucais de pacientes suspeitos. WILBUR (2012) e colaboradores realizaram um experimento cujo método de coleta foi baseado em esfregaço oral por meio de *swab* (*oral swab PCR* - OSP). Para tanto, amostras orais foram coletadas de múltiplas populações de macacos da Ásia e de Gibraltar. Os resultados mostraram que o OSP detectou o DNA do CMtb presente na mucosa oral de 263 PNH sinantrópicos de 11 espécies distintas, provenientes de cinco países e em contextos distintos de contato humano, tais como templos, animais de estimação ou de espetáculos, de vida livre ou de zoológicos. Em 84 animais (31,9%) foi detectado o DNA do CMtb. Como esperado, as maiores prevalências foram encontradas nos países onde o contato dos animais com os humanos é mais intenso. Outras pesquisas experimentais são necessárias para validar o protocolo do OSP para PNH, pois o mesmo se mostrou mais preciso que o teste tuberculínico, além de ser de mais fácil aplicação e interpretação. Além disso, a capacidade de detectar mais facilmente a presença de DNA de TB, a facilidade de obtenção da amostra, a vantagem de não depender do sistema imune do animal e a relativa simplicidade do teste o tornam promissor no monitoramento de colônias de PNH para TB (CAMPOS, 2006; WILBUR et al., 2012; WILBUR; ENGEL; JONES-ENGEL, 2012).

A PCR apresenta maior sensibilidade na detecção de Mtb comparada com a coloração de ZN, pois a técnica não amplifica o DNA da MOTT (*mycobacteria other than tuberculosis*), frequentemente isolada em outros tipos de ensaios (ALFONSO et al., 2004).

Estudos têm sido realizados na tentativa de demonstrar que a maioria dos testes moleculares são específicos e sensíveis na detecção do CMtb, enfatizando a capacidade de serem incorporados aos testes de TB nos protocolos de quarentena em criações de PNH (ALFONSO et al., 2004).

2.6.3.2. Sistema GeneXpert® Mtb/RIF

O sistema GeneXpert Dx é composto por um computador, um leitor de código de barras e software pré-instalado para efetuar testes em amostras colhidas e visualizar os resultados (Figura 2.1). O sistema requer a utilização de cartuchos Xpert Mtb/RIF (Figura 2.2), contendo todos os reagentes que promovem a reação (Figura 2.3), descartáveis, o que reduz o risco da ocorrência de contaminação (BRATS, 2011; VAN RIE et al., 2012).

Em 2010, esta plataforma foi recomendada pela OMS para o diagnóstico inicial em pacientes com TB e suspeita de multirresistência ou coinfeção pelo HIV, em razão da elevada precisão e do custo-efetivo relativamente baixo do teste. No Brasil, a técnica foi aprovada pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias em Saúde para sua inclusão no SUS em setembro de 2013 (PINTO et al., 2015). Trata-se de um método de diagnóstico rápido que consiste na purificação, concentração e amplificação de ácidos nucleicos de Mtb pela técnica de PCR em tempo real, tendo como principal benefício à integração automatizada dos processos de extração do DNA, amplificação e detecção. A técnica permite identificar o material genético de micobactérias do CMtb em duas horas, inclusive as resistentes à rifampicina (RIF) (BRATS, 2011; VAN RIE et al., 2012).



Foto: Laine Wílma do Nascimento

Figura 2.1: Sistema automatizado GeneXpert Dx. A: computador e leitor com código de barras; B: Cartuchos descartáveis Xpert Mtb/Rif; C: Reagentes.

O teste é amplamente utilizado para o diagnóstico de TB em humanos e hoje vem sendo utilizado como triagem para detecção de TB em PNH do SCPrim (ICTB-

Fiocruz) a partir de uma parceria entre as equipes do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHR) / Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (Ensp/Fiocruz) e o ICTB-Fiocruz. A parceria resultou na publicação de um artigo que detectou infecção ativa por TB resistente a RIF nos PNH. O trabalho avaliou o uso do ensaio molecular Xpert Mtb/RIF, que se mostrou eficiente por gerar resultados em apenas 2 horas, o que acelera a execução das ações de profilaxia, reduzindo as chances de propagação da doença não só na colônia, mas também entre os trabalhadores. Os resultados demonstraram que o Xpert Mtb/RIF é eficiente, mas deve ser complementado com o teste padrão-ouro, que é a cultura bacteriológica (ALVES DA SILVA et al., 2017), uma vez que a recomendação é de associar métodos para a obtenção de resultados mais fidedignos.

2.6.4. Anátomo-patológicos

Os programas para o manejo da TB em colônias de PNH geralmente envolvem testes tuberculínicos regulares associados a outros métodos de diagnóstico, incluindo exames histopatológicos de biópsias e necropsias (DILLEHAY; HUERKAMP, 1990; AMORIM, 2015).

O aspecto histopatológico clássico da TB pulmonar é o granuloma com necrose caseosa central. A TB extrapulmonar (TBEP) na forma miliar ou granulomatosa, portanto, as características histopatológicas variam conforme os órgãos e/ou sistemas acometidos. O exame macroscópico permite identificar a lesão granulomatosa e outras apresentações da lesão tecidual causada pelo bacilo. No entanto, para assegurar que determinada lesão é tuberculosa, torna-se necessário realizar a coleta do material para que seja encaminhado para análise histopatológica, bacteriológica e molecular e, assim, identificar o *Mycobacterium* na amostra. No caso da TB ganglionar, deve-se coletar a amostra do gânglio afetado para o exame bacteriológico e histopatológico, por biópsia ou por punção aspirativa; é menos invasivo e pode ser realizado em ambulatório. Entretanto, em outras formas paucibacilares de TBEP, ou seja, que apresentam poucos bacilos, a coleta de material pode exigir recursos cirúrgicos, o que cria obstáculos para o diagnóstico. Por este motivo torna-se imprescindível uma estrutura adequada que garanta nível de biossegurança satisfatório para execução do procedimento. O achado do

granuloma específico ou do bacilo sela o diagnóstico (CAMPOS, 2006; BRASIL, 2011).

Por se tratar de um agente etiológico do grupo de risco III, capaz de infectar por de aerossóis, a recomendação é que a área de manipulação do agente disponha de barreiras de contenção primárias e secundárias. As primárias constituem as técnicas e práticas padronizadas, o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) e o emprego de equipamentos de proteção coletiva (EPCs), como por exemplo, a cabine de segurança biológica, essencial para reduzir a contaminação do ambiente durante a abertura das carcaças. As barreiras de contenção secundárias são estabelecidas pelo desenho das instalações que devem ser, preferencialmente, isoladas em edifícios ou em módulos separados e com acesso controlado. Deve oferecer sistemas de ventilação especializados que assegurem fluxo de ar direcionado e a exaustão com troca de ar e filtro HEPA e os efluentes devem receber o tratamento exigido por normas de biossegurança (BRASIL, 2008).

Fragmentos de tecido com lesões sugestivas de TB, com ou sem lesões macroscópicas, devem ser enviados para exame histopatológico em frasco de boca larga, hermeticamente fechado, imersos em solução de formaldeído a 10%, observando-se a proporção de uma parte de amostra para 10 de formaldeído e à temperatura ambiente. Esse material não deve ser congelado ou resfriado (BRASIL, 2006).

Assim, para o correto diagnóstico da TB em um animal ou um grupo de animais é recomendável a combinação de técnicas diagnósticas por meio de exames bacteriológicos, imunológicos, moleculares e histopatológicos e os resultados de todas essas análises devem ser confrontados então ao histórico clínico-epidemiológico e/ou achados anátomo-patológicos, a fim de se tomarem as ações mais coerentes na prevenção e controle da doença (LECU; SASCHA; FRANZ-JOSEF, 2008). Além disso, um serviço que realize a necropsia do animal com programa de vigilância da TB *post-mortem* é indispensável, pois em associação com outras medidas, potencializa a eficácia das tentativas de exclusão do patógeno em uma criação de PNH (FOX; COHEN; LOEW, 2002).

2.7 Controle e erradicação da tuberculose em criação de primatas não humanos

O controle da TB se fundamenta no bloqueio de pontos críticos da cadeia de transmissão da doença. É importante conhecer a situação sanitária em uma unidade de criação com suspeita de TB para que sejam empregadas as medidas profiláticas cabíveis, de acordo com a realidade da instituição. Em se tratando de PNH, a recomendação do Ministério da Agricultura é a eutanásia dos animais reagentes (BRASIL, 2006).

A fim de aperfeiçoar a detecção da infecção por CMtb em colônias de PNH é necessário o uso de protocolos de rastreio que incorporem métodos que permitam a análise da tipagem da carga genética do grupo de *Mycobacterium* do CMtb circulante nos grupos de PNH. A detecção dos casos de TB resistentes aumenta a capacidade de elucidar os padrões de transmissão da doença (WILBUR et al., 2012).

2.7.1. Rastreabilidade do bacilo

Os PNH podem albergar o Mtb por anos sem que apresentem sinais clínicos da doença e como não há um teste diagnóstico com 100% de exatidão, torna-se necessário associar vários métodos de diagnóstico quando a suspeita clínica é elevada (LIN et al., 2008). A dificuldade em se detectar a infecção latente se reveste de um entrave para estudos que pesquisam a resposta imunológica da TB. O teste ideal deveria ser capaz de detectar os diferentes estágios de infecção, incluindo os assintomáticos ou latentes, de forma rápida, segura e de fácil interpretação, ou seja, identificar o animal infectado antes da transmissão do bacilo a outros indivíduos (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001; WILBUR et al., 2012).

A doença nos PNH, em termos de progressão, pode ser classificada como rápida, ativo-crônica e latente (FLYNN et al., 2003). Por ser uma zoonose de elevada importância epidemiológica, os animais podem constituir uma fonte de infecção aos profissionais que lidam direta e indiretamente com eles (BAKKER, 2008). Logo, torna-se evidente a necessidade da rastreabilidade do bacilo também nos profissionais. Assim, é recomendável que, tanto os trabalhadores quanto os

animais, sejam submetidos à anamnese e exames periódicos para a triagem do bacilo (ANDERSEN et al., 2000; LECU; SASCHA; FRANZ-JOSEF, 2008).

O teste tuberculínico com PPD nos funcionários deve ser realizado a cada seis meses. As pessoas com reação ≥ 10 mm devem ser submetidas a exame radiológico pulmonar ou outro teste adicional para diagnóstico de TB. Pessoas com clínica compatível à TB devem ser imediatamente encaminhadas para o atendimento médico e caso a doença seja confirmada o funcionário deverá ser afastado para tratamento (BUSHMITZ et al., 2009).

2.7.2. Manejo com primatas não humanos

Nos programas para o manejo da TB em colônias de PNH, todos os animais devem ser observados diariamente por um técnico treinado para reconhecer sinais de doença, lesão ou comportamento anormal. Podem ser necessárias observações mais específicas durante a recuperação pós-operatória, no caso de animais enfermos ou em estado de déficit físico com procedimentos de manejo para a vigilância e diagnóstico de doenças. Os óbitos súbitos e os sinais de doença, aspectos depressivos ou outros desvios devem ser relatados e prontamente investigados. Os programas de monitoramento da saúde animal dependem das espécies envolvidas e do foco da pesquisa institucional (NRC; ILAR, 2011).

Os procedimentos para prevenção, diagnóstico e terapia de doenças devem ser aqueles atualmente preconizados pelas normativas das práticas veterinárias. Em relação à TB, os PNH geralmente são submetidos aos testes tuberculínicos de rotina (semestrais ou anuais), necropsia de animais PPD-positivos e quarentena dos animais comprovadamente expostos ao bacilo. Os métodos sorológicos, análise de DNA utilizando PCR, cultura microbiana, bioquímica do sangue para avaliações clínicas, histopatologia e outras técnicas emergentes validadas, também podem ser utilizados para confirmar um diagnóstico (NRC; ILAR, 2011).

Uma vez detectada qualquer alteração na sanidade do animal, realiza-se uma anamnese detalhada, incluindo a investigação da ocorrência de doenças prévias e a inspeção visual, que poderá determinar a necessidade de captura e contenção para coleta de material biológico ou tratamento (LOPES et al., 2010). Os animais que apresentarem sinais clínicos sugestivos de TB devem ser isolados para

evitar disseminação de uma suposta enfermidade, visando manter os outros animais saudáveis e ilesos de quaisquer infecções durante o processo de diagnóstico (DILLEHAY; HUERKAMP, 1990; NRC; ILAR, 2011).

Durante a primeira semana de quarentena, os procedimentos de avaliação do estado sanitário dos animais suspeitos no que tange tanto aos aspectos físicos como psicológicos, devem ser realizados duas vezes ao dia, podendo-se passar a apenas uma vez ao dia no restante do período. Observações como a identificação e remoção de animais mortos no recinto e a contagem dos animais são importantes no período de quarentenamento (BRASIL, 2016b).

Apesar de instituições de pesquisas adotarem procedimentos rigorosos na detecção e prevenção da introdução de animais infectados, surtos de TB em criadouros de PNH ainda ocorrem, deduzindo-se que, pelo menos, alguns desses surtos surgiram a partir da reativação de infecções latentes não detectadas previamente. Por esta razão, um protocolo para quarentena deve ser instituído de acordo com cada instituição, levando-se em conta a sua realidade sanitária, as enfermidades endêmicas da região e a origem dos animais recebidos, aplicando métodos considerados eficientes na triagem de doenças. Assim, o processo de quarentena inclui o isolamento dos animais (importados, suspeitos ou doentes), os testes diagnósticos e o respeito às normas de biossegurança (MÜLLER et al., 2010).

A limitação de acesso às colônias em quarentena deve ser rigorosa, restrita aos funcionários designados para esta função. A área do quarentenário deve estar distante da área de exposição (ideal 100 m de distância) (BUSHMITZ et al., 2009). Caso exista infraestrutura adequada de isolamento, o ideal é que a área de quarentena para TB possua pressão interna negativa em relação às outras áreas da criação. O corpo técnico responsável deve se dedicar exclusivamente a este setor; quando isto não for possível, o fluxo dos funcionários deve ser organizado de tal forma que eles primeiro cuidem da higienização da área principal e depois passem para a área de quarentena, encaminhando-se, primeiramente, para a “área limpa” e, em seguida, para a “área suja”. Os profissionais devem ser treinados em procedimentos operacionais padronizados (POPs) relacionados às medidas profiláticas que apontem como evitar a transferência de patógenos das áreas de quarentena ou isolamento para as áreas consideradas livres de agentes patogênicos (IPS, 2007), evitando-se, dessa maneira, a transmissão de doenças de animais suspeitos deste setor para animais saudáveis e para os funcionários (BUSHMITZ et

al., 2009). O animal com resultados de testes positivos para TB, durante a quarentena, deve ser submetido à eutanásia (BRASIL, 2016b).

O § 1º do artigo 14 da Lei nº 11.794, de 2008 determina critérios de indicação para eutanásia em situações onde não há a possibilidade da adoção de medidas alternativas, entre eles o fato de representar uma ameaça à saúde pública e risco à fauna nativa ou ao meio ambiente. Neste contexto, um animal suspeito de TB pode representar um risco potencial; portanto, é recomendado submetê-lo à eutanásia. É importante levar em consideração a legislação pertinente a este procedimento (MCTI, 2013, BRASIL, 2013). Nesse momento de atenção dobrada, é essencial que se faça o registro das anormalidades para futuros rastreios.

2.7.3. Medidas profiláticas

Em uma criação de PNH com suspeita de TB, medidas profiláticas podem estar fundamentadas, por exemplo, em um programa de imunização baseado em um levantamento prévio dos fatores de riscos biológicos em potencial e/ou latentes, aos quais os profissionais estejam expostos ao longo do processo de trabalho. O programa visa efetivar as ações de biossegurança por meio da construção dos mapas de riscos e da capacitação profissional com treinamento extra e continuado, principalmente dos POPs e, assim, garantir o franco desenvolvimento das atividades nos diferentes setores. Os mapas de riscos possibilitam reavaliar as condutas de trabalho, com base na experiência cotidiana e coletiva vivenciada, objetivando a prevenção de acidentes e doenças ocupacionais, redução de impactos ambientais, promoção da saúde do trabalhador e preservação do meio ambiente (ANDRADE et al, 2010).

Considerando um cenário de surto de TB em uma colônia de PNH, as instalações de barreiras são medidas profiláticas primárias decisivas quando é necessário evitar a propagação ou o acesso destes agentes às áreas bioprotégidas (MÜLLER et al., 2010). Neste contexto, higiene pessoal, por exemplo, constitui uma importante barreira primária contra infecções. O hábito de lavar as mãos antes e após manipular qualquer animal auxilia na redução do risco de disseminar doenças e de autoinfecção (ANDRADE; OLIVEIRA; PINTO, 2006). Outra medida eficaz para dificultar a disseminação do patógeno é o uso correto dos EPIs pelos profissionais,

ferramentas de trabalho destinadas à sua proteção para minimizar riscos associados ao tipo e quantidade de agente infeccioso, tempo de exposição e sensibilidade do organismo de cada profissional, de modo a garantir a segurança e a saúde no trabalho. Os EPIs indispensáveis para desenvolver o manejo com primatas são uniformes apropriados, botas ou calçados fechados de uso exclusivo no ambiente de trabalho, visor de proteção, touca, máscara, luvas, sapatilhas e jalecos descartáveis. Para a proteção contra a TB são utilizadas as máscaras dos tipos N95 ou PFF2, que apresentam porosidade de eficiência igual ou maior do que 95%, para reter partículas de 0,3 µm. Os EPCs garantem a segurança da equipe enquanto um grupo de pessoas realiza determinada tarefa ou atividade, sendo de extrema importância uma vez que protege o coletivo (BRASIL, 2008).

No contexto de um surto de TB, as medidas administrativas visam desenvolver e efetivar políticas na forma de orientações técnicas e protocolos, com a finalidade de assegurar a rápida identificação, isolamento, diagnóstico e tratamento de indivíduos com provável TB pulmonar (ativa) (BRASIL, 2011).

Medidas de controle ambiental são fortemente recomendadas, visto que o bacilo da TB é capaz de sobreviver durante meses no meio ambiente, aumentando sua chance de infectar outros animais susceptíveis. Existem algumas estratégias que podem diminuir o seu carreamento, tais como: i) desinfecção dos recintos e dos equipamentos de contenção (puçás e gaiolas de contenção), com imersão em hipoclorito de sódio (5%), desinfetante Virkon[®] (monopersulfato de potássio), entre outros (Tabelas 1 e 2). É importante fazer rodízio de desinfetantes nos recintos; ii) poda drástica das árvores para aumentar a incidência de luz solar e diminuir a umidade; iii) higienização ambiental e pedilúvio na entrada da colônia e de cada recinto (ex: pó de hidróxido de cálcio - cal); v) construção de áreas de isolamento entre as diferentes criações animais; vi) controle de acesso de pessoas às criações (BRASIL, 2006).

Quando uma criação de PNH se encontra sob suspeita de surto de TB, deve-se iniciar uma triagem de diagnóstico clínico e laboratorial para detectar animais TB-positivos e posterior eutanásia dos mesmos. É imprescindível a correta manipulação do animal “*post-mortem*”, atentando-se ao destino correto da carcaça (BRASIL, 2006; ANVISA, 2004).

São considerados resíduos sólidos do grupo A2 as carcaças que apresentam as seguintes condições: i) provenientes de animais submetidos a

processos de experimentação com inoculação de micro-organismos, bem como suas forrações; ii) de animais suspeitos de infecção por agente de relevância epidemiológica e com risco de disseminação; iii) de animais que foram submetidos ou não a estudos anátomo-patológicos. É mandatório proceder ao tratamento das carcaças contaminadas e acondicioná-las de forma devida antes da sua destinação final (ANVISA, 2004).

É provável que a incorporação destas medidas no processo de manejo seja um dos fatores efetivos para controlar um surto de TB, bloqueando, dessa forma, a disseminação do patógeno no criatório suspeito e, possivelmente, evitando a circulação de bacilos do CMtb no ambiente onde os animais estão inseridos.

Quadro 2.1: Desinfetantes utilizados em casos de tuberculose bovina

DESINFETANTE	CONCENTRAÇÃO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	TEMPERATURA DE UTILIZAÇÃO	USO INDICADO
Hidróxido de cálcio (Cal)	20%	3 horas	Ambiente	Instalações e solo
Cresóis	5%	3 horas	Ambiente	Instalações
Fenol	5%	3 horas	37°C	Instalações
Formol	7,5% ¹	3 horas	Ambiente	Instalações, utensílios e roupas
Hipoclorito de Cálcio	5%	3 horas	Ambiente	Instalações e utensílios
Hipoclorito de Sódio	5%	3 horas	Ambiente	Instalações e utensílios
Soda cáustica	2,5-3%	3 horas	60°C	Instalações e utensílios

¹Equivalente a 3% de formaldeído. Fonte: BRASIL (2006).

Quadro 2.2: Quantidade de desinfetante a ser utilizada para cada tipo de material a ser desinfetado

ITEM A SER DESINFETADO	QUANTIDADE DE DESINFETANTE A SER UTILIZADO/L	UNIDADE
Instalações	1	m ²
Esterco líquido	1	L
Pisos de terra	5	m ²
Utensílios	2	kg
Roupas de trabalho	5	kg
Veículos em geral	1	m

Fonte: BRASIL (2006).

3. JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma das principais doenças infecciosas transmissíveis em PNH (ENARSON; CHRETIEN, 1999; RÜSCH-GERDES, 1999; ZUMLA et al. 1999), uma vez que são animais altamente suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis*, tendo relatos também de infecção por *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* e *M. intracellulare* (VERVENNE et al., 2004; ANDRADE; OLIVEIRA; PINTO, 2006). A incidência é maior em primatas cativos do Velho Mundo, com alta prevalência em macacos rhesus (*Macaca mulatta*), podendo levar a óbito em menos de um ano, geralmente dentro de quatro a seis meses (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001).

Embora já exista um protocolo de assistência a pacientes humanos com TB, não há orientações direcionadas para o controle de surto de TB em populações de PNH, tornando-se um risco para saúde pública. Assim, defrontando-se com a problemática do surto de TB nas criações símias do ICTB-Fiocruz instaurado desde 2011 e na ausência de um protocolo padrão para lidar com as inúmeras variáveis, foi criado um grupo consultivo (GC), formado pela equipe do ICTB, bem como por profissionais especialistas de dentro e de fora da Fiocruz. O grupo teve a missão de determinar uma série de orientações relacionadas à biossegurança e rastreabilidade do bacilo nos PNH e humanos por meio de métodos de diagnóstico. Condutas de manejo animal também foram traçadas pelo GC, estabelecendo um protocolo fundamentado nas orientações vigentes nacionais (BRASIL, 2008) e internacionais (FELASA, 1999; BUSHMITZ et al., 2009) para o controle do surto.

Mediante a experiência obtida nesse processo e o conhecimento adquirido ao longo do período de controle do patógeno nas colônias, foi importante descrever a dinâmica do manejo animal e métodos de diagnóstico, pormenorizando práticas de identificação de sinais clínicos de primatas compatíveis com TB, contenção física e química, coleta e preparo de amostras biológicas, eutanásia e gerenciamento de resíduos e carcaças. Assim, fundamentando-se nas recomendações que direcionam a manipulação das diversas amostras e seus processamentos, incluindo as técnicas adotadas para um diagnóstico preciso, o desenvolvimento de um manual de procedimentos padronizados para o diagnóstico da TB nos PNH do ICTB/ Fiocruz mostrou-se de grande valia, com vistas ao controle desta zoonose em diferentes criadouros científicos.

Tendo em vista a escassez de literaturas voltadas a este tema no Brasil, o “manual de procedimentos para estudos diagnósticos de TB em PNH para uso científico” tem condições de oferecer suporte técnico a um plano de contingência com orientações que direcionam as condutas em outras instituições mantenedoras de PNH com suspeita de contaminação por Mtb, contribuindo como elemento norteador para viabilizar o controle epidemiológico da infecção por Mtb nas criações símias.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Com o intuito de auxiliar profissionais que trabalham na área da Primatologia, este projeto tem o objetivo de reunir informações teóricas e práticas acerca do manejo, processamento de diferentes amostras biológicas e procedimentos de diagnósticos de TB em criações de PNH sob suspeita de surto.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar um estudo bibliográfico sobre as peculiaridades etiológicas, patogênicas, clínicas, epidemiológicas e profiláticas da TB em PNH, visando compreender melhor a dinâmica comportamental do bacilo em criações símias;
- Realizar um levantamento documental das normativas nacionais e internacionais que direcionam os diferentes métodos de diagnóstico de TB em PNH;
- Elaborar fluxos de rastreabilidade do bacilo da TB nas criações de PNH do SCPrim (ICTB-Fiocruz), determinando, assim, uma sequência de ações que auxiliem nas medidas de prevenção e controle da doença;
- Elaborar o “Manual de Procedimentos para Estudos Diagnósticos de Tuberculose em Primatas não Humanos para Uso Científico”.
- Proporcionar elementos técnicos para elaborar diferentes procedimentos operacionais padronizados (POPs) no âmbito do SCPrim (ICTB-Fiocruz) voltados para as questões desta temática.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para alcançar os objetivos propostos foi embasada em pesquisa documental das recomendações nacionais e internacionais e na legislação brasileira para biossegurança no manuseio de amostras biológicas provenientes de PNH cativos. A partir do mapeamento de todas as diretrizes e recomendações, sinalizando as particularidades do agente infeccioso em questão, foram desenvolvidas as demais etapas metodológicas.

5.1. Pesquisa documental

A pesquisa foi baseada especialmente nos seguintes documentos regulamentadores e fontes bibliográficas de caráter técnico-científico:

- a) Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal/PNCEBT - MAPA (BRASIL, 2006);
- b) Primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino e pesquisa científica, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal/CONCEA (BRASIL, 2016b);
- c) Guidelines for the prevention and control of tuberculosis in nonhuman primates (BUSHMITZ et al., 2009);
- d) FELASA guidelines and recommendations. Federation of European Laboratory Animal Science/Felasa (GUILLEN, 2012);
- e) Publicações de temas sobre TB como doença de caráter zoonótico; epidemiologia o enfretamento da TB junto ao Sistema Único de Saúde (SUS); relatos de surtos de TB em outras instituições onde há criações de PNH para fins científicos e em zoológicos em animais sinantrópicos; métodos convencionais e novos ensaios de diagnóstico e desinfecção;
- f) POPs de consultas institucionais internas;
- g) Relatórios emitidos pelo SCPrim (ICTB-Fiocruz);
- h) Laudos do estado de saúde dos animais e resultados de diagnósticos laboratoriais.

5.2. Elaboração de fluxos de monitoramento do bacilo da tuberculose

Baseado na busca supracitada e de posse da experiência da equipe no que diz respeito ao manejo, criação e experimentação de PNH com suspeita de TB, foram elaborados fluxos de monitoramento do bacilo dentro das criações símias do SCPrim (ICTB-Fiocruz). Os fluxos demonstram de forma esquemática todas as práticas voltadas para a medicina preventiva, processamento de amostras biológicas e destinação de resíduos e carcaças.

Para a elaboração dos fluxos, procurou-se descrever uma série de ações que devem ser adotadas de forma sequenciada, unidirecional lógica de processos interligados, com o intuito de identificar o agente infeccioso e, assim, estabelecer um planejamento de triagem preventiva de infecção para reduzir o risco de contaminação cruzada, visando resguardar tanto os seres humanos como os animais (BUSHMITZ et al., 2009).

Assim, pautados na vivência de lidar com um surto desta natureza, os fluxos apontam direcionamentos passo a passo e procedimentos específicos, delineando o programa de controle sanitário adotado no âmbito institucional, demonstrado por fluxogramas pelo software Bizagi Modeler® (2016).

O detalhamento dos trabalhos reflete a prática adotada pela equipe de trabalhadores do SCPrim (ICTB-Fiocruz) em interface com a equipe do CRPHF (ENSP-Fiocruz). Todas as atividades descritas foram norteadas por orientações e recomendações legais no que se refere a TB em PNH, para padronizar procedimentos como:

- I. Identificação de TB nos profissionais envolvidos;
- II. Acesso controlado às colônias de primatas;
- III. Procedimentos de manejo animal na identificação do CMtb;
- IV. Leitura do teste tuberculínico de PNH;
- V. Processamento laboratorial das amostras biológicas;
- VI. Rastreabilidade do bacilo da TB em uma criação com suspeita de surto;
- VII. Rotina dos estudos patológicos para pesquisa de TB;
- VIII. Descarte de carcaças.

Uma vez descritos tais procedimentos, foi possível prosseguir com as etapas subsequentes deste trabalho.

5.3. Elaboração do manual técnico

A partir da coletânea dos dados obtidos, este trabalho foi concretizado com a elaboração do “Manual de Procedimentos para Estudo Diagnóstico de Tuberculose em Primatas não Humanos para Uso Científico”.

O manual foi confeccionado a partir das análises realizadas durante o desenvolvimento da pesquisa de Mestrado Profissional em Ciências em Animais de Laboratório (MPCAL), que junto aos discentes e docentes do curso, viabilizaram o entendimento para a sua concretização.

Para a redação deste manual, buscou-se padronizar métodos e procedimentos, tais como:

- Coleta, armazenamento e processamento de material biológico para fins de diagnóstico;
- Manejo de PNH procedentes de criações com suspeita de TB;
- Controle de acesso às colônias;
- Rastreabilidade do bacilo nos animais e nos trabalhadores;
- Descarte de resíduos e carcaças potencialmente infectadas por TB.

O manual também incorporou os fluxos detalhados conforme previamente mencionado.

5.4. Preparo para a elaboração de Procedimentos operacionais padronizados (POPs)

A construção de todo esse material oferece respaldo técnico para elaborar POPs no âmbito do SCPrim (ICTB-Fiocruz), relacionados:

- I. às medidas de biossegurança mediante um surto de TB em PNH;
- II. à coleta de amostras biológicas de PNH para testes diagnósticos de TB;
- III. à descrição do fluxo de tecidos e fluidos corporais de PNH a serem coletados, processados e encaminhados aos diferentes laboratórios de diagnóstico de TB.

6. RESULTADOS

Os dados de literatura mapeados neste trabalho resultaram na elaboração do “*Manual de Procedimentos para Estudo Diagnóstico de Tuberculose em Primatas não Humanos para Uso Científico*” (Figura 6.1).

A obra dispõe de informações sobre os problemas que a TB representa para a saúde pública sob o aspecto do seu caráter zoonótico, enfatizando a necessidade de barreiras sanitárias que, efetivamente, evitem o carreamento do patógeno em uma instalação de PNH. Aponta a dinâmica de fluxos contínuos na manipulação de PNH com suspeita de contaminação por micobactéria de modo a instituir um conjunto de ações uniformes, como um elemento norteador para viabilizar o diagnóstico e o controle epidemiológico da infecção por TB na Fiocruz ou em instituições que criam estes animais.

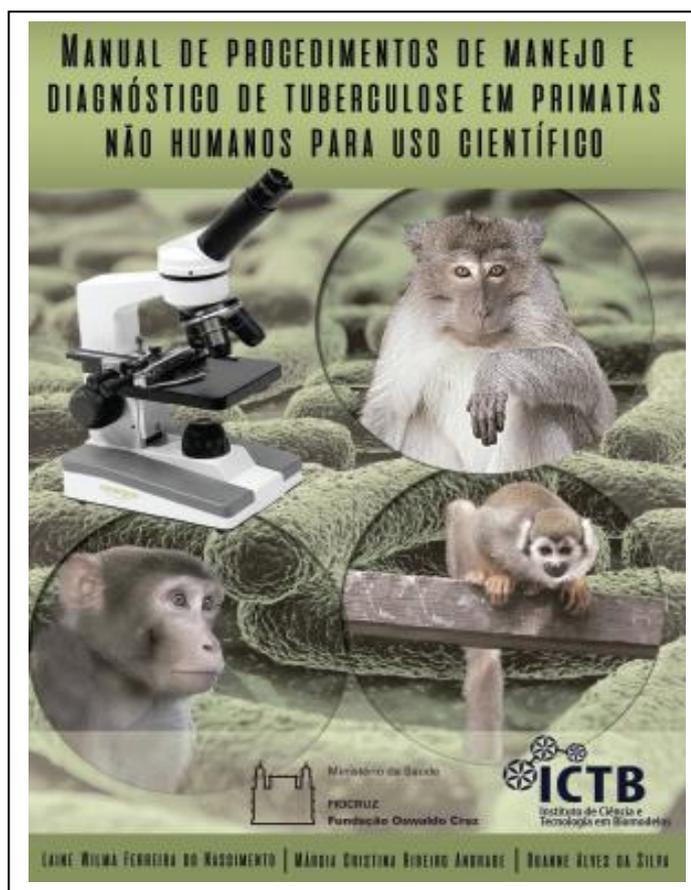


Figura 6.1: Capa do Manual.

O sumário detalha os títulos e subtítulos e cada assunto está subdividido em tópicos e subtópicos de modo a facilitar a busca por determinadas informações (Figura 6.2).

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14	3. MEDICINA PREVENTIVA DE PRIMATAS DE CATIVEIRO	44	5.4.3.2 Semeadura para isolamento de micobactérias	84
1. PRIMATAS NÃO HUMANOS E SURTO DE TUBERCULOSE NA ESFERA DA FIOCRUZ	18	3.1. Biossegurança e barreiras sanitárias	44	5.4.4. Diagnóstico molecular por MAS-PCR	85
1.1. O uso de primatas não humanos (PNH) na Fiocruz	19	3.2. Equipamentos de proteção individual e coletivo	44	5.4.4.1. Protocolo para execução da MAS-PCR	86
1.1.1. Macacos rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	20	3.3. Medidas de prevenção e controle	47	5.4.5. Estudos patológicos	87
1.1.1.1. Descrição dos recintos dos macacos rhesus do SCPrim (ICTB-Fiocruz)	21	3.4. Gerenciamento de resíduos e descarte de carcaças	51	6. FLUXOS DE RASTREABILIDADE DO BACILO DA TUBERCULOSE EM CRIAÇÕES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	92
1.1.2. Macacos cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	22	3.5. Saúde do trabalhador	54	6.1. Identificação de TB nos profissionais envolvidos	92
1.1.2.1. Descrição dos recintos dos macacos cynomolgus do SCPrim (ICTB-Fiocruz)	24	4. MANEJO COM PRIMATAS NÃO HUMANOS	59	6.2. Acesso controlado às colônias de primatas	94
1.1.3. Macacos-de-cheiro (<i>Saimiri sciureus</i> e <i>S. ustus</i>)	24	4.1. Vistoria diária	59	6.3. Procedimentos de manejo animal na identificação do CMtb	94
1.1.3.1. Descrição dos recintos dos macacos-de-cheiro do SCPrim (ICTB-Fiocruz) ..	26	4.2. Contenção animal	60	6.4. Leitura do teste tuberculínico de PNH	95
1.2. Identificação de um surto de tuberculose nas criações de PNH do ICTB	27	4.2.1. Contenção física	60	6.5. Processamento laboratorial das amostras biológicas	95
2. TUBERCULOSE EM PRIMATAS NÃO HUMANOS	30	4.2.2. Contenção química	63	6.6. Rastreabilidade do bacilo da TB em uma criação com suspeita de surto	96
2.1. Etiologia	30	4.3. Isolamento e quarentena	63	6.7. Rotina dos estudos patológicos para pesquisa de TB	96
2.2. Transmissão/Patogênese	31	4.3.1. Teste subcutâneo tuberculínico (TST)	65	6.8. Descarte de carcaças	97
2.3. Manifestação clínica	34	4.3.2. Coleta de materiais biológicos para exames complementares	67	7. PERSPECTIVAS E DESAFIOS: É POSSÍVEL GARANTIR PROTEÇÃO A CRIAÇÕES DE PRIMATAS QUANDO O BACILO DA TUBERCULOSE REPRESENTA AMEAÇA CONTÍNUA?	107
2.3.1. Manifestação clínica da TB na infecção latente	34	4.4. Eutanásia	67	7.1. Transferência das criações para região afastada dos centros urbanos ...	108
2.3.2. Manifestação clínica da TB ativa na infecção primária	34	5. COLETA E MANIPULAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE	71	7.2. Preservação do patrimônio genético e reprodução assistida	111
2.3.3. Manifestação clínica da TB aguda	35	5.1. Coleta de amostras biológicas	71	7.3. Imunização	113
2.4. Epidemiologia	36	5.2. Procedimento para coleta	72	7.4. Tratamento da TB em primatas	114
2.4.1. Aspectos epidemiológicos relacionados ao ambiente dos primatas analisados	37	5.2.1. Amostras sanguíneas	72	CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
2.4.2. Registros de casos positivos/suspeitos de TB nos PNH do ICTB-Fiocruz	38	5.2.2. Amostras de esfregaço bucal e lesões sugestivas de TB	73		
2.5. Caráter zoonótico da doença	40	5.2.3. Tecidos e órgãos para necropsia	75		
		5.3. Acondicionamento e transporte	77		
		5.4. Processamento de amostras biológicas	80		
		5.4.1. Processamento do sangue para obtenção de soro	80		
		5.4.2. Triagem pelo teste rápido molecular para TB (Gene Xpert®)	81		
		5.4.3. Diagnóstico bacteriológico: descontaminação e cultura	84		
		5.4.3.1. Descontaminação	84		

Figura 6.2: Sumário do manual

Imbuído no objetivo de discorrer sobre um conjunto de ações de manejo e procedimentos de diagnóstico de TB em primatas, o manual está organizado em sete capítulos, que aliado aos dados técnicos, detém uma riqueza de ilustrações que facilitam o entendimento do leitor.

6.1. Capítulo 1: Primatas não Humanos e o surto de tuberculose na esfera da Fiocruz

A obra expõe inicialmente uma breve introdução sobre o uso científico dos PNH na Fiocruz e a ocorrência do surto de TB nas criações símias da instituição. Aborda sobre o papel da instituição de pesquisa Fiocruz e sua missão em gerar, absorver e difundir conhecimentos científicos e tecnológicos em saúde por meio da integração das atividades multidisciplinares de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, ensino, produção de bens, prestação de serviços de referência e informação apoio estratégico ao SUS. Dentro da estrutura organizacional da Fiocruz está inserido o ICTB, responsável pela produção e fornecimento de biomodelos, inclusive os PNH que representam um patrimônio animal de extrema importância para os estudos nos mais variados campos da investigação científica, vista a real necessidade de se testarem vacinas e drogas nas diferentes espécies símias com o intuito de salvar vidas humanas. O SCPrim cria e mantém quatro espécies sendo estas os macacos rhesus (*Macaca mulatta*) (Figura 6.3), macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (Figura 6.4) e macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus* e *S. ustus*) (Figura 6.5) com o objetivo principal da manutenção de fornecer animais para uso em pesquisas relacionadas a drogas e testes vacinais contra várias doenças infecciosas tropicais.



Foto: Beatriz Goldschmidt

Figura 6.3: Macaco rhesus (*Macaca mulatta*).



Foto: Daniel Roede

Figura 6.4: Macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*).

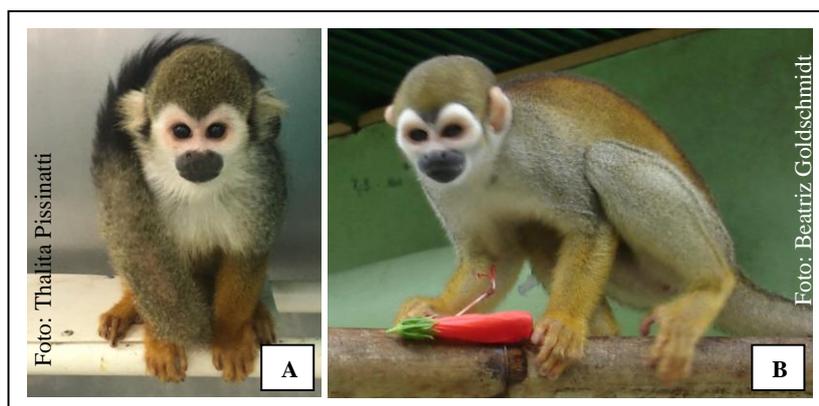


Foto: Thalita Pissinatti

Foto: Beatriz Goldschmidt

Figura 6.5: Macacos-de-cheiro. A: *Saimiri sciureus*; B: *S. ustus*.

Em seguida, o capítulo mostra as características estruturais dos recintos de macacos rhesus (Figura 6.6), macacos cynomolgus (Figura 6.7) e macacos-de-cheiro (Figura 6.8), onde os animais são mantidos. O ambiente no entorno das gaiolas é composto por um bosque de árvores frutíferas e ornamentais e funciona como uma barreira física de forma a minimizar exposição dos animais, proteger de ventos dominantes, diminuir o estresse visual entre os grupos sociais, gerar sombreamento dos recintos com consequente aumento do conforto térmico, além de proporcionar um ambiente mais natural que melhora o bem-estar animal.



Figura 6.6: Recintos dos macacos rhesus; A: Gaiola inteira, mostrando subdivisão; B: Detalhe mais aproximado de parte da gaiola com um grupo social. Fonte: ICTB-Fiocruz.



Figura 6.7: Recinto dos macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Fonte: ICTB-Fiocruz



Figura 6.8: Recintos dos macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp.). Fonte: ICTB-Fiocruz

Finalmente, foi explicitado que o elevado custo dos animais, as considerações éticas e as dificuldades de se realizar testes diagnósticos por limitações orçamentárias, impulsionaram amplos estudos nesta área para compreensão da saúde dos animais e dos seres humanos, assim como da qualidade da pesquisa como um todo. Por representar um elemento fundamental para a investigação epidemiológica, bem como para a tomada de ações de manejo

dos animais, foram firmadas parcerias entre o ICTB e outras unidades, assim como com outras instituições nacionais e internacionais.

6.2. Capítulo 2: Tuberculose em primatas não humanos

Este capítulo versa sobre a dinâmica do bacilo da TB em PNH, descrevendo aspectos concernentes à etiologia, modo de transmissão, patogênese, manifestação clínica e estudos epidemiológicos voltados para o surto de TB ocorrido nos PNH procedentes das colônias do SCPrim (ICTB-Fiocruz). O capítulo oferece subsídios para uma melhor compreensão sobre o comportamento do agente dentro de uma população animal e todas as medidas adotadas para o combate do mesmo em criações símias.

Expõe os agentes etiológicos e ressalta aspectos biológicos e epidemiológicos do bacilo e os impactos causados em criações de PNH e para saúde pública.

A Figura 6.9 resume o mecanismo de combate ao patógeno no organismo de um hospedeiro.

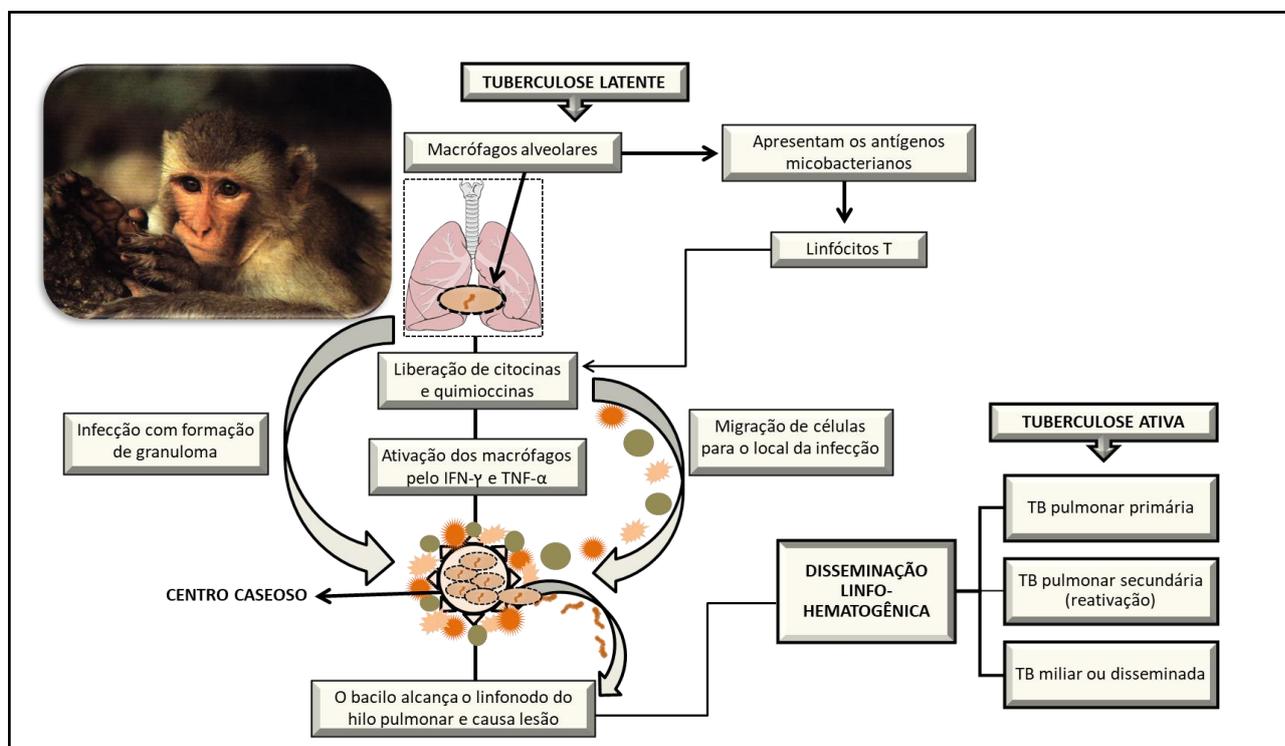


Figura 6.9: Demonstração esquemática da patogênese do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).

Em seguida, faz-se menção sobre as diferentes manifestações clínicas da TB, enfatizando que o espectro da doença nos primatas se apresenta de forma semelhante ao da doença nos humanos, com manifestações variando de TB latente à ativa e índices de mortalidade significantes (WILBUR; ENGEL; JONES-ENGEL, 2012).

A TB em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) pode se desenvolver de forma aguda e progressiva, desencadeando lesão pulmonar, com pontos de abscessos localizados (Figura 6.10A). Casos de TB cutânea primária e secundária são caracterizados por feridas não cicatrizantes, úlceras drenantes ou trajetos fistulosos combinados com o aumento dos linfonodos (MÄTZ-RENSING et al., 2015). A Figura 6.10B mostra uma lesão de TB ganglionar, característica em macacos rhesus.



Figura 6.10: Lesões características de tuberculose em macacos rhesus (*M.mulatta*). A: Abscesso pulmonar; B: Linfadenite inguinal supurativa bilateral. Fonte:SCPrim-ICTB (Fiocruz).

Em macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp.), os animais infectados por TB apresentaram, principalmente, manifestações cutâneas com abscessos localizados, notadamente na região submandibular (Figura 6.13), presença de linfonodos edemaciados (Figura 6.24), além de lesões granulomatosas típicas, identificadas em especial no fígado (Figura 6. 24B) e no baço (Figura 6.24C).

Quanto aos aspectos epidemiológicos, o capítulo 2 registra a relação do surto das criações de PNH da Fiocruz com a prevalência da doença no seu entorno. É sabido que o estado do RJ é endêmico para TB. O Complexo de Manguinhos, por exemplo, comunidade localizada a aproximadamente 60 metros do campus, apresentou, em 2015, uma taxa de incidência de 268 para 100 mil habitantes, ou seja, mais de oito vezes a taxa nacional, estimada em 30,9/100 mil habitantes no mesmo período. Este cenário epidemiológico reflete diretamente na ocorrência do surto de TB nas colônias de PNH da Fiocruz, pois os animais se encontram alojados em ambientes abertos, facilitando a transmissão por aerossóis potencialmente contaminados, enfatizando também que são animais altamente sensíveis ao referido patógeno (AFN, 2013) (Figura 6.11).

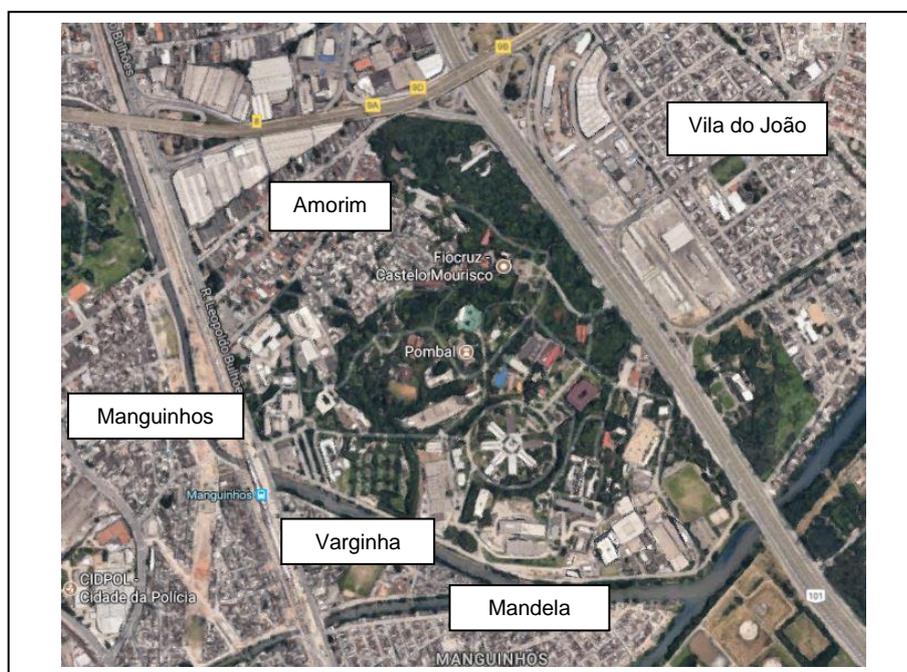


Figura 6.11: Vista aérea do campus da Fiocruz e as comunidades que a circundam. Fonte: -22.875008°, -43.2477307,17° (Google Maps).

O capítulo aborda, ainda, os registros de casos positivos/suspeitos de TB nos PNH do ICTB-Fiocruz (Figura 6.12).

Em 2012, um elevado número de eutanásias em macacos rhesus ($n = 183$), foram realizadas como uma medida de controle, decidindo-se submeter à eutanásia todos os animais de um mesmo grupo social quando mais de 30% dos indivíduos de uma determinada família apresentava resultados positivos para o bacilo da TB. A partir de 2013, notou-se uma drástica redução de macacos rhesus positivos/suspeitos e o número de eutanásias foi reduzido de 34% ($183/546 = n^{\circ}$ de óbitos por

eutanásia/ total de animais no plantel no ano), para 0,4% (2/549). Os casos positivos ou suspeitos aumentaram em 2015 (2,7%; 12/447) e reduziram novamente nos anos subsequentes (2016 = 0; 2017 = 0,2%)¹.

Nos macacos cynomolgus foi realizado um número relativamente elevado de eutanásias, considerando que o plantel desta espécie era de um total de 75 exemplares (15%; 11/75), reduzindo-se ao longo dos anos, até a total negação no presente ano¹.

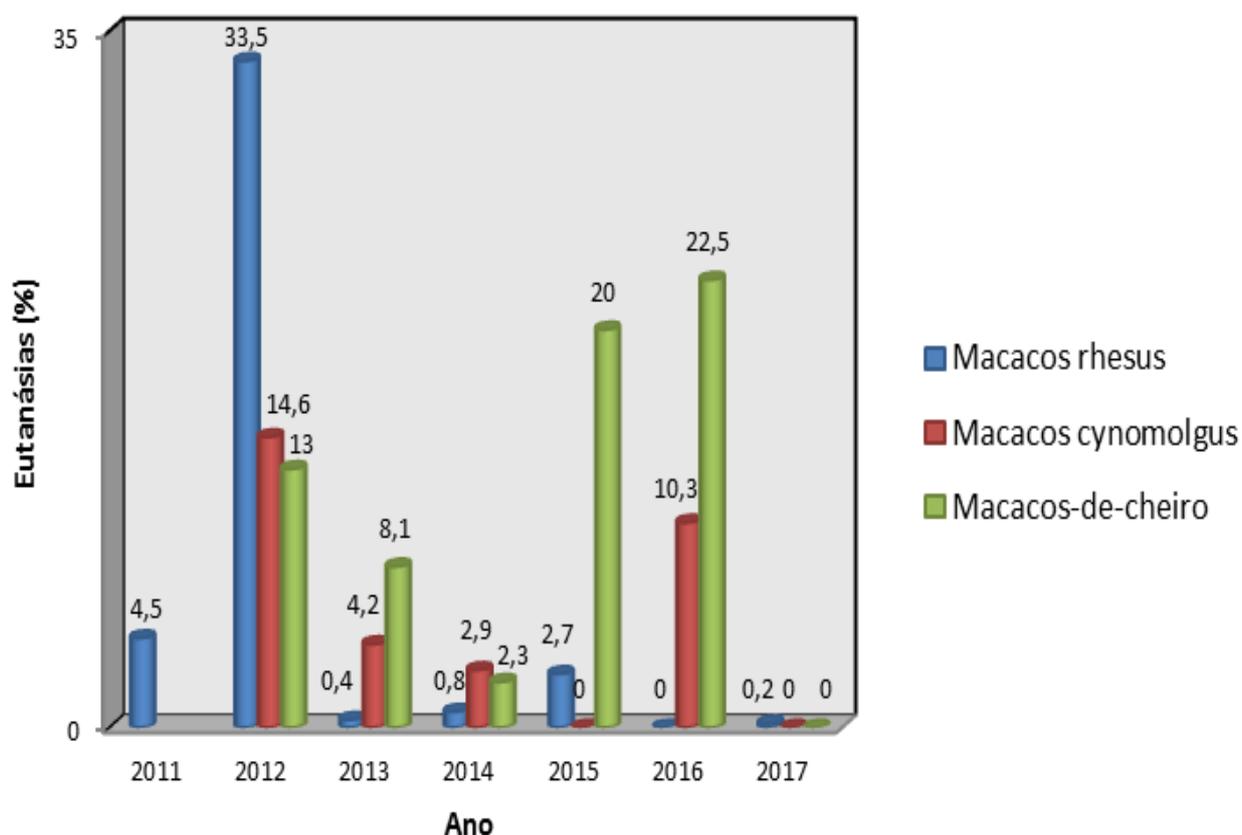


Figura 6.12: Registros de eutanásias dos animais devido a positivities ou suspeitas de TB nas espécies de primatas procedentes do criadouro científico do ICTB- Fiocruz entre os anos de 2011 a 2017. Fonte: ICTB/CRPHF-Fiocruz.

¹ Dados extraídos dos relatórios técnicos do SCPrim/ICTB e do CRPHF/ENSP-Fiocruz.

Dentre os macacos-de-cheiro, houve um índice de 13% de eutanásias (38/293) no início da investigação do TB em 2012. Observou-se uma oscilação nos registros de animais positivos/suspeitos ao longo dos anos estudados, com um ápice em 2016 (22,5%; 54/240). O número elevado de eutanásias nos macacos-de-cheiro nos anos de 2015 e 2016 se deu em função do aparecimento de abscessos localizados na região submandibular (Figura 6.13) e que, assim como nos macacos rhesus, por medida de controle, esses animais foram submetidos à eutanásia imediatamente. Posteriormente, além da positividade para o bacilo da TB em algumas dessas lesões de abscessos cutâneos, foram detectados em outros abscessos, também, outros dois agentes bacterianos: *Yersinia* sp. e *Klebsiella* sp. A partir de tal constatação, os animais infectados pelos dois últimos patógenos, receberam os devidos tratamentos².



Figura 6.13: Abscesso cutâneo na região submandibular em um *Saimiri sciureus*.

6.3. Capítulo 3: Medicina preventiva de primatas de cativeiro

Em função da característica zoonótica da doença e do potencial risco de contaminação ao se manejar primatas, a prática da medicina preventiva se torna imperiosa para se evitar a transmissão de diferentes enfermidades, especificando as

² Dados extraídos dos relatórios técnicos do SCPrim/ICTB e CRPHF/ENSP-Fiocruz.

peculiaridades da TB, a fim de se trabalhar de forma mais segura. EPIs e EPCs, bem como técnicas de prevenção/control, destinação de resíduos biológicos e descarte de carcaças e cuidados com a saúde do trabalhador são temas traçados no capítulo 3.

O capítulo atenta para as questões de biossegurança no manuseio de PNH, mostrando barreiras sanitárias, uso de EPIs (Figura 6.14) e EPCs (Figura 6.15), medidas de prevenção e controle, gerenciamento de resíduos e de carcaças e saúde do trabalhador. Os EPIs indispensáveis para desenvolver o manejo com primatas são uniforme apropriado, botas ou calçados fechados de uso exclusivo no ambiente de trabalho, visor de proteção, touca, máscara, luvas, sapatilhas e jalecos descartáveis. Para a proteção contra a TB são utilizadas as máscaras dos tipos N95 ou PFF2 (BRASIL, 2011) (Figura 6.16).



Figura 6.14: Equipamentos de proteção individual. A: Visor de proteção; B: Bota; C: Jaleco descartável; D: Máscara PFF2; E: Luva descartável; F: Sapatilha descartável; G: Touca descartável.



Figura 6.15: Equipamentos de proteção coletiva. A: Caixa coletora de perfurocortantes; B: Cabine de fluxo laminar com lâmpada UV; C: Lava olhos.



Figura 6.16: Profissional paramentado.

Como medidas de controle ambiental, podem-se adotar ações como desinfecção dos recintos e dos equipamentos de contenção (puçás e gaiolas de contenção), com imersão em hipoclorito de sódio (5%) ou desinfetante Virkon[®], higienização ambiental; implantação de pedilúvio na entrada da colônia e de cada recinto [ex: pó de hidróxido de cálcio (cal)] (Figura 6.17), uso da vassoura de fogo para uma desinfecção física (Figura 6.18) e, no caso de área arborizada ou coberta por vegetação, adoção de poda programada (MELO; AFIUNE, 1993) foram descritas neste capítulo.



Figura 6.17: Pedilúvio com cal na entrada no recinto dos animais. A: Técnico usando o pedilúvio com cal para entrar no recinto; B: Detalhe do recipiente contendo a cal para constituir o pedilúvio.



Figura 6.18: Desinfecção física do recinto com vassoura de fogo.

O capítulo 3 indica também orientações sobre o gerenciamento de resíduos, principalmente os perfurocortantes e de carcaça. As carcaças devem ser armazenadas em freezer (Figura 6.19) e identificadas. Quando sob suspeita de apresentarem de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, devem ser tratadas antes da deposição final (ANVISA, 2004).



Figura 6.19: Armazenamento de carcaças em freezer antes e após a realização da necropsia. A: Carcaça no freezer antes da necropsia; B: Carcaça em freezer após a necropsia. Fonte: ICTB-Fiocruz.

O final deste capítulo apresenta recomendações relacionadas à saúde do trabalhador no que se refere à sanidade da equipe de funcionários. O acompanhamento deve ser clínico e por meio de exames como o teste tuberculínico, exame radiológico pulmonar ou outro teste diagnóstico adicional; é imprescindível que haja um programa de imunização baseado em um levantamento prévio dos fatores de riscos biológicos em potencial e/ou latentes e também, o acesso às informações quanto aos riscos e a importância em ser instruído para procedimentos de emergência (COHEN; KRISHNAMOORTHY; WRIGHT, 2002) e notificação, no caso de exposições ou suspeitas de problemas relacionados à sua saúde (NRC, 1997).

A construção dos mapas de riscos e a capacitação profissional com treinamento extra e continuado, principalmente dos procedimentos operacionais padronizados (POPs) são essenciais para prevenir acidentes e doenças ocupacionais, reduzir impactos ambientais, promover a saúde do trabalhador e preservar o meio ambiente (ANDRADE; LEITE; CABELLO, 2009).

Por tudo isso, espera-se que, com as explicações desta seção, o leitor possa aperfeiçoar conhecimentos sobre biossegurança, de um modo geral, que tem importância ímpar neste tipo de trabalho. Um profissional sensibilizado tem maior probabilidade de respeitar as normas o que contribui para redução do risco de se contaminar e carrear o bacilo em seu próprio ambiente e para fora dele.

6.4. Capítulo 4: Manejo de primatas não humanos

O capítulo 4 delinea, de forma profícua, condutas padronizadas de contato com os animais, incluindo inspeções, contenções físicas e químicas, isolamento/quarentena e critérios de eutanásia. Os profissionais que lidam diretamente com esses animais devem possuir domínio dos métodos de avaliação do seu estado de saúde, aplicação de tratamento ou eutanásia quando recomendados, e reconhecimento dos hábitos e comportamentos típicos das espécies envolvidas.

A vistoria diária é primordial para detectar qualquer alteração na sanidade do animal. Uma vez que observada alguma alteração, é preciso aplicar técnicas de captura seja por meio de puçá (Figura 6.20) ou condicionamento (Figura 6.21), contenção física e química para avaliação médica.

Com relação ao processo de quarentena, foi enfatizada a necessidade de avaliar o estado de saúde do animal, diagnosticar e tratar enfermidades, reconhecer os hábitos e comportamentos dos animais e executar o manejo diário, atribuições dos profissionais designados exclusivamente para quarentena. A duração da quarentena tem que ser de, no mínimo, 42 dias (seis semanas); entretanto, esse período pode ser diferente, pois dependerá dos testes de diagnósticos adotados, número de repetições e interpretação dos resultados. A realização periódica do teste tuberculínico é obrigatória no quarentenamento e a aplicação pode ser feita na margem superior côncava da pálpebra ou no abdômen (Figura 6.22) (BUSHMITZ et al., 2009).

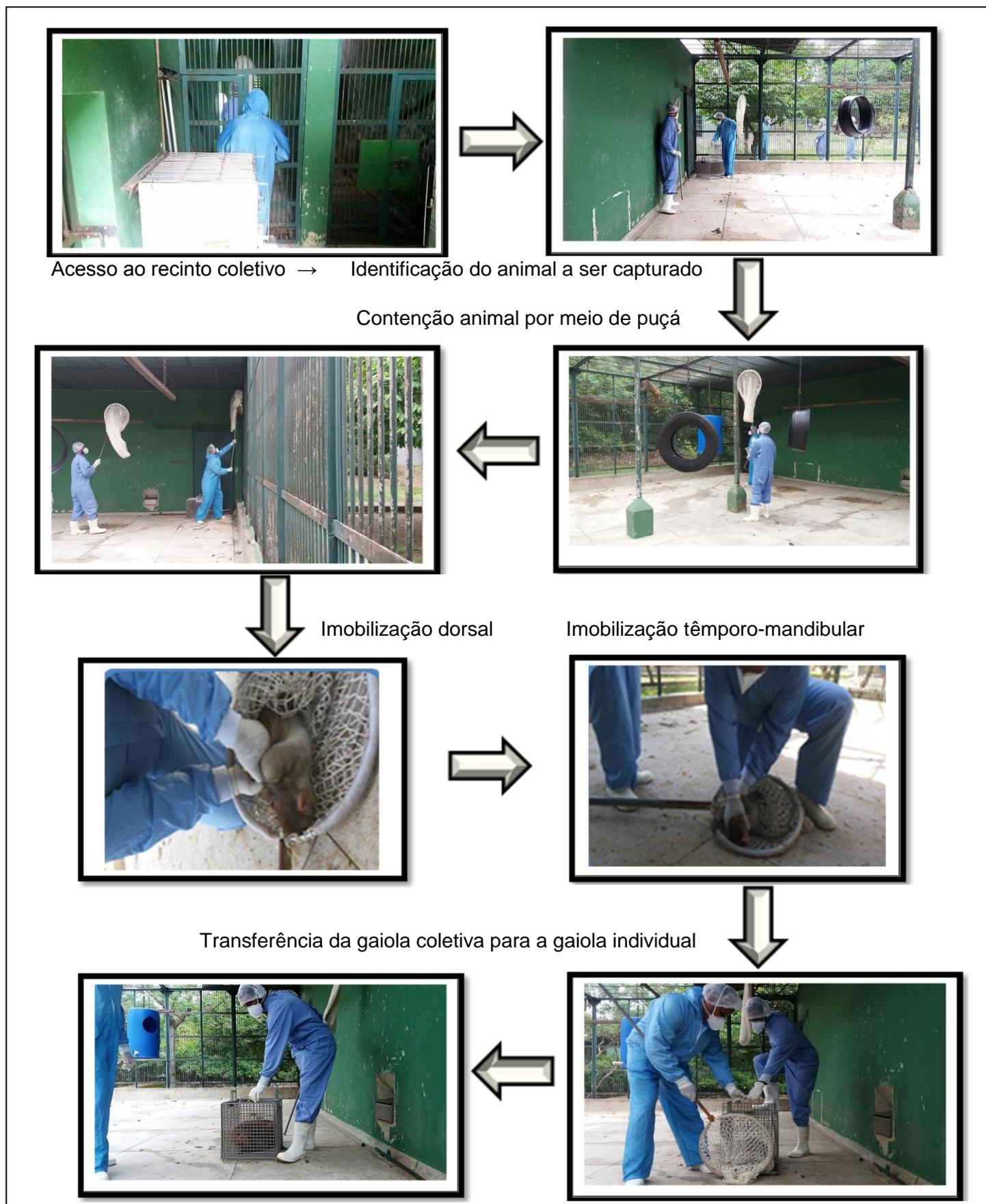


Figura 6.20: Conjunto de ações de contenção física de macacos rhesus Fonte: ICTB-Fiocruz.



1 - Com os animais contidos no refúgio, o técnico entra no recinto.



2 - Posiciona a gaiola de transporte no interior do recinto.



3 - A gaiola de transporte é colocada aberta em frente à entrada do refúgio.



4 - O técnico sai do recinto, abre a guilhotina e espera o animal entrar na gaiola.



5 - O animal, já treinado, entra calmamente na gaiola.



6 - Ao visualizar a entrada do animal na gaiola, o técnico fecha a guilhotina.



7 - O técnico entra no recinto e fecha a gaiola de transporte.



8 - Com o animal devidamente contido, o procedimento pode ser iniciado.

Figura 6.21: Condicionamento para contenção física em macaco rhesus. Fonte: ICTB-Fiocruz.

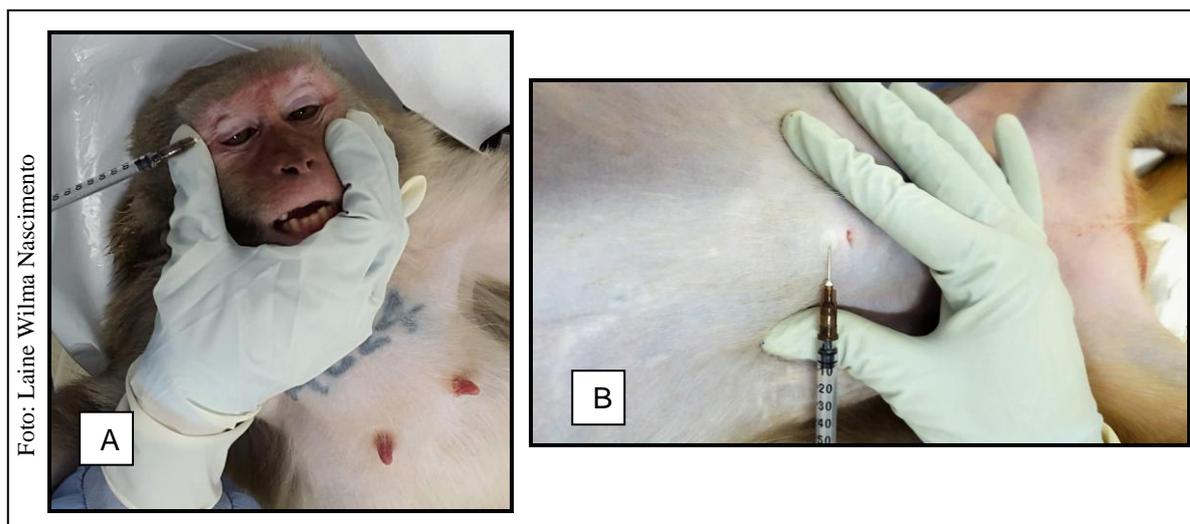


Figura 6.22: Teste tuberculínico em macaco rhesus (*Macaca mulatta*). A: região palpebral; B: região periumbilical. Fonte: ICTB-Fiocruz.

Este é um tema de destaque no manual, pois o correto manejo com PNH com suspeita de TB desempenha um papel crucial para promover o bem-estar dos animais que precisam ser manipulados continuamente.

6.5. Capítulo 5: Coleta e manipulação de amostras biológicas para diagnóstico de tuberculose

No quinto capítulo, detalhou-se a coleta e a manipulação das amostras biológicas, que são de suma importância para que se faça o correto diagnóstico da TB. As amostras coletadas devem ser armazenadas para que não haja perdas até que sejam transportadas ao local, onde serão processadas e utilizadas nos devidos testes de diagnósticos para rastreamento na colônia.

O capítulo detalha os procedimentos necessários para a coleta de:

- i) amostras sanguíneas em PNH, preferencialmente, acessando a veia femoral com o animal posicionado em decúbito dorsal (Figura 6.23);
- ii) tecidos e órgãos para necropsia que frequentemente determinam a causa *mortis* (Figura 6.24)
- iii) esfregaço bucal e lesões sugestivas de TB. Fricciona-se a mucosa oral do animal delicadamente com o swab (WILBUR; ENGELJONES-ENGEL, 2012) ao longo do interior da bochecha por cerca de 10 segundos (7-8 vezes), para obter células e saliva (WOOD et al., 2015) (Figura 6.25). Fragmentos de tecidos para biópsia também podem ser coletados.



Figura 6.23: Coleta de sangue pela veia femoral de um macaco rhesus (*Macaca. mulatta*) posicionado em decúbito dorsal. Fonte: ICTB-Fiocruz.

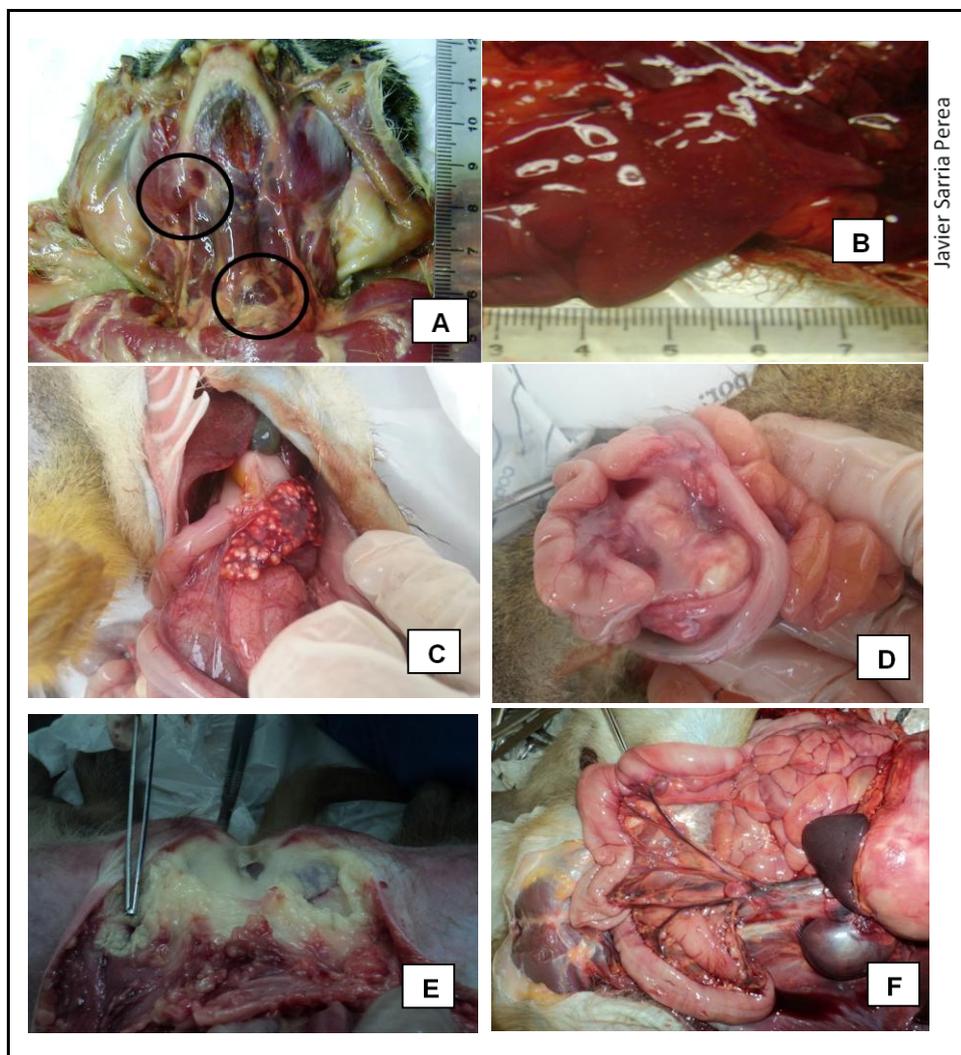


Figura 6.24: Lesões macroscópicas de tuberculose em *Saimiri sciureus* (A-D) e *Macaca mulatta* (E-F) A: Linfonodos subclavicular e submandibular edemaciados; B: Tuberculose miliar no parênquima hepático; C: Lesões granulomatosas no baço; D: Granuloma na região intestinal; E: Abscesso em linfonodo inguinal; F: Linfonodo mesentérico infartado.

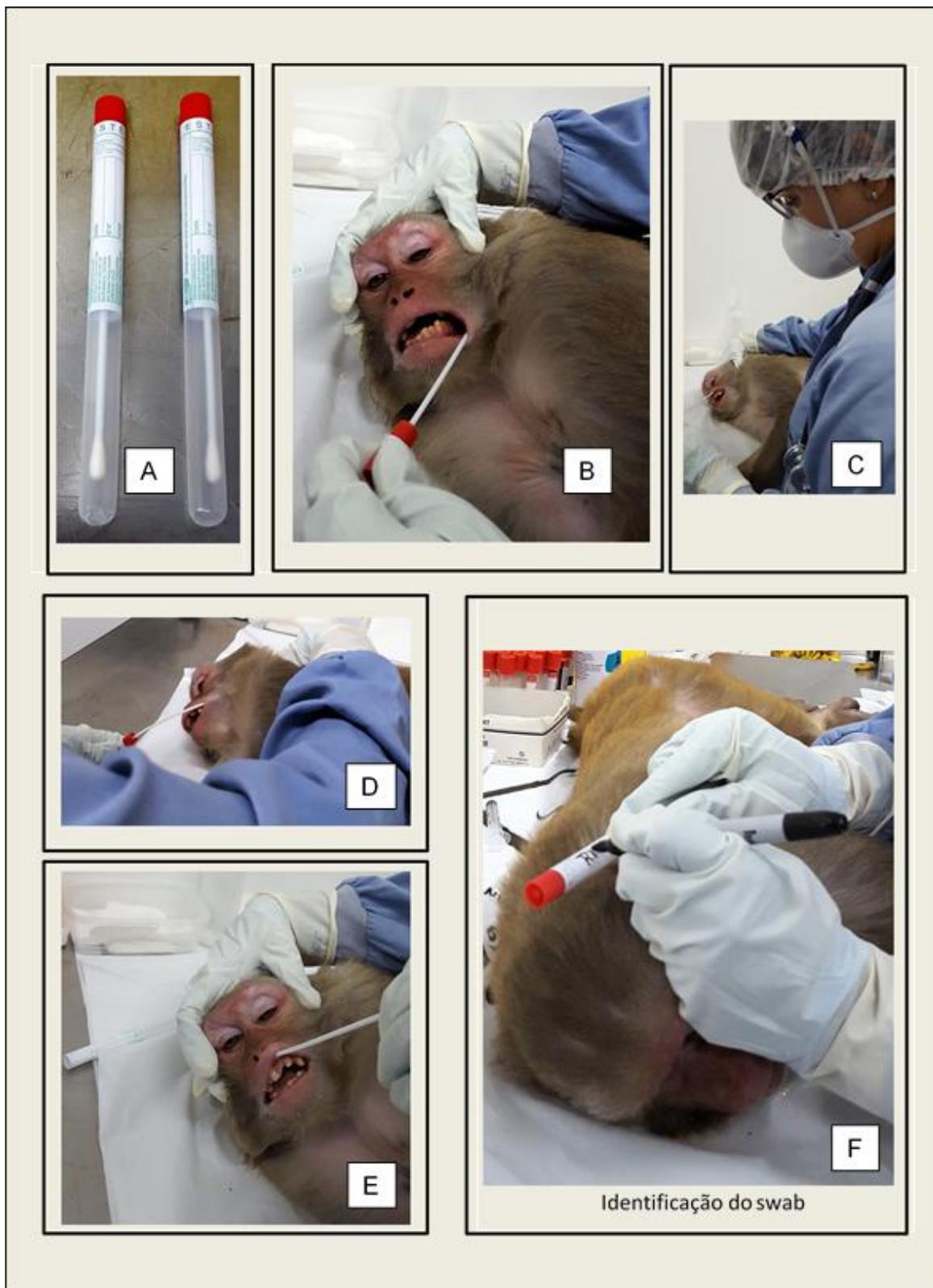


Figura 6.25: Esfregaço de mucosa oral por meio de swab. A: Swab de transporte; B, C, D, E: Coleta de mucosa oral por swab; F: Identificação do swab. Fonte: ICTB-Fiocruz.

No que se refere ao acondicionamento e transporte, a orientação é que se tenha uma embalagem primária com recipiente rotulado, resistente, com tampa com rosca e à prova de vazamento do produto a ser transportado. Deve-se ter uma embalagem secundária com o compartimento no qual será acondicionado o recipiente primário, que também deve ser estanque, além de uma embalagem externa (recipiente terciário), no qual será acondicionado o recipiente secundário, que deve ser resistente o suficiente para proteger o conteúdo de influências externas, como, por exemplo, da exposição à água e danos físicos durante o transporte. Amostras biológicas em swab, por exemplo, devem ser acondicionadas em caixa isotérmica usada para o transporte, identificada com a etiqueta "Risco Biológico" e envolvidas por gelo reciclável (Figura 6.26) (AIRES et al., 2015).

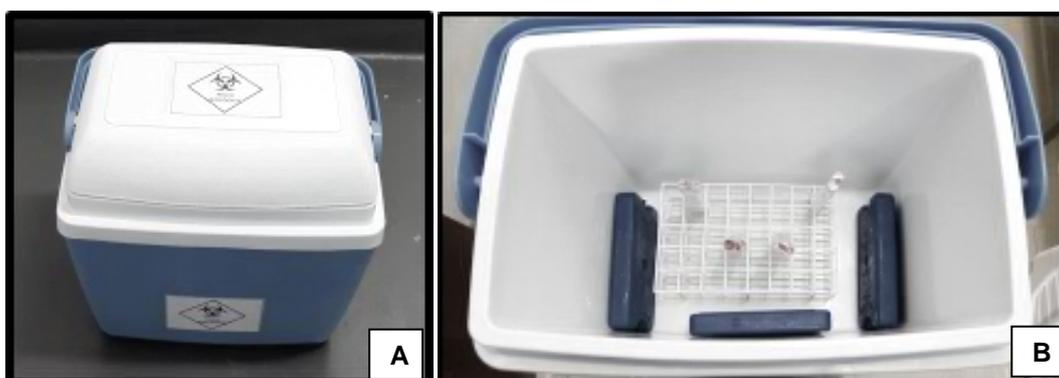


Figura 6.26: Caixa de transporte de amostras biológicas. A: Caixa isotérmica sinalizada; B: Swabs dentro da caixa isotérmica refrigerada por gelo reciclável. Fonte: ICTB-Fiocruz.

É importante que se tenham formulários, integrados à terceira embalagem, com dados da amostra, cartas e outras informações que a identifiquem ou a descrevam (AIRES et al., 2015), de forma que as solicitações estejam conservadas dentro de um saco plástico e presas firmemente, com fita adesiva, sobre a tampa, do lado externo da caixa. Jamais colocar as solicitações dentro da caixa junto com as amostras (Figura 6.27) (BRASIL, 2008). Após coletadas, as amostras devem ser enviadas em até 24 horas. Caso contrário, devem ser mantidas em freezer à -70°C .

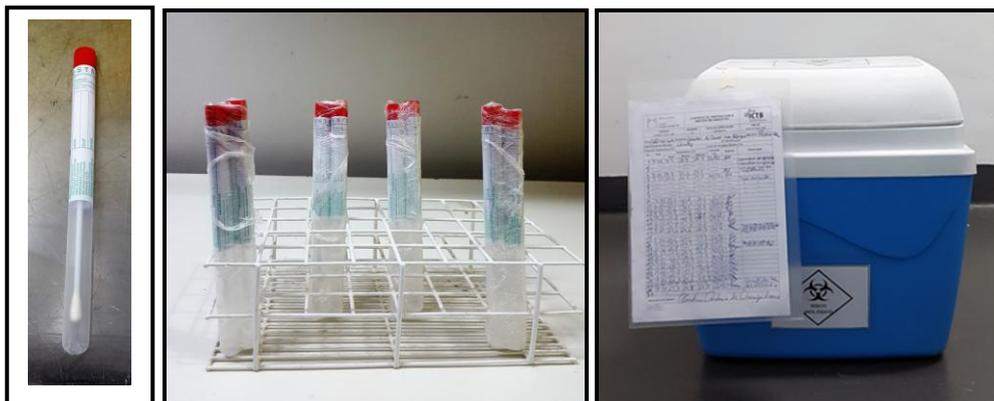


Figura 6.27: Acondicionamento e identificação de amostras biológicas.
Fonte: ICTB-Fiocruz.

É abordado também sobre o que é preciso para conter possível vazamento e, em caso de acidente o indivíduo exposto deve ser encaminhado imediatamente para avaliação médica, para que sejam verificadas possibilidades de contaminação e, assim, serem tomadas providências preventivas ou terapêuticas, quando indicadas. A notificação à chefia imediata e à instituição deve ser feita assim que for possível (AIRES et al., 2015).

O manual explana, ainda, sobre o processamento das amostras biológicas para:

- i. Sangue para obtenção de soro descrita em etapas (Figura 6.28);
- ii. Diagnóstico bacteriológico. Para isso, é realizada a descontaminação para minimizar o crescimento de outras bactérias e somente as micobactérias possam se multiplicar na cultura (BRASIL, 2013). Utiliza-se o agente N-acetil-L-cisteína (NALC) associado ao tampão citrato e a solução de NaOH 4% sendo a combinação NALC-NaOH, indicada para amostras paucibacilares, e recomendada para a maioria dos sistemas comerciais de cultura (BRASIL, 2008). A semeadura para isolamento de micobactérias utiliza o meio de cultura LJ, contendo verde de malaquita 2%, corante que inibe a microbiota contaminante. A interpretação é feita por observação das características morfológicas da colônia em relação à presença de pigmento e aspecto (lisa ou rugosa) e a contaminação parcial ou total por outras bactérias. A Figura 6.29 exhibe os resultados de cultura positiva e negativa para *M. tuberculosis*.
- iii. Esfregaço oral por swab para teste rápido molecular para TB (Gene Xpert[®]) (Figura 6.30) realizado com base em protocolos de pesquisa revisados e

aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Pesquisa de Animais da Universidade de Washington, de acordo com os princípios da Sociedade Americana de Primatologistas (ASP) para o Tratamento Ético de PNH;



Figura 6.28: Obtenção de amostras sorológicas para composição do banco de soros (soroteca). Fonte: ICTB-Fiocruz.

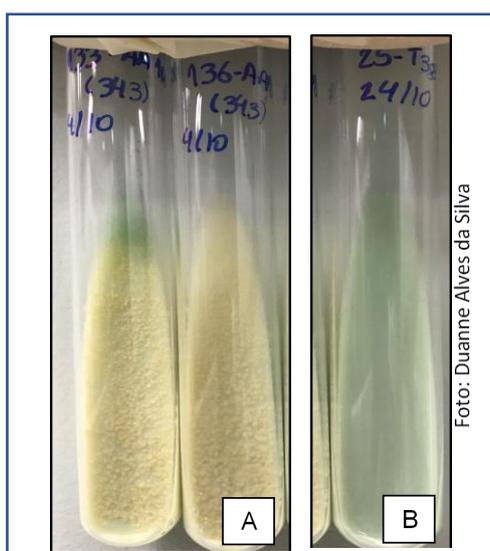


Figura 6.29: Crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em meio de cultura LJ. A: Cultura positiva; B: Cultura negativa.

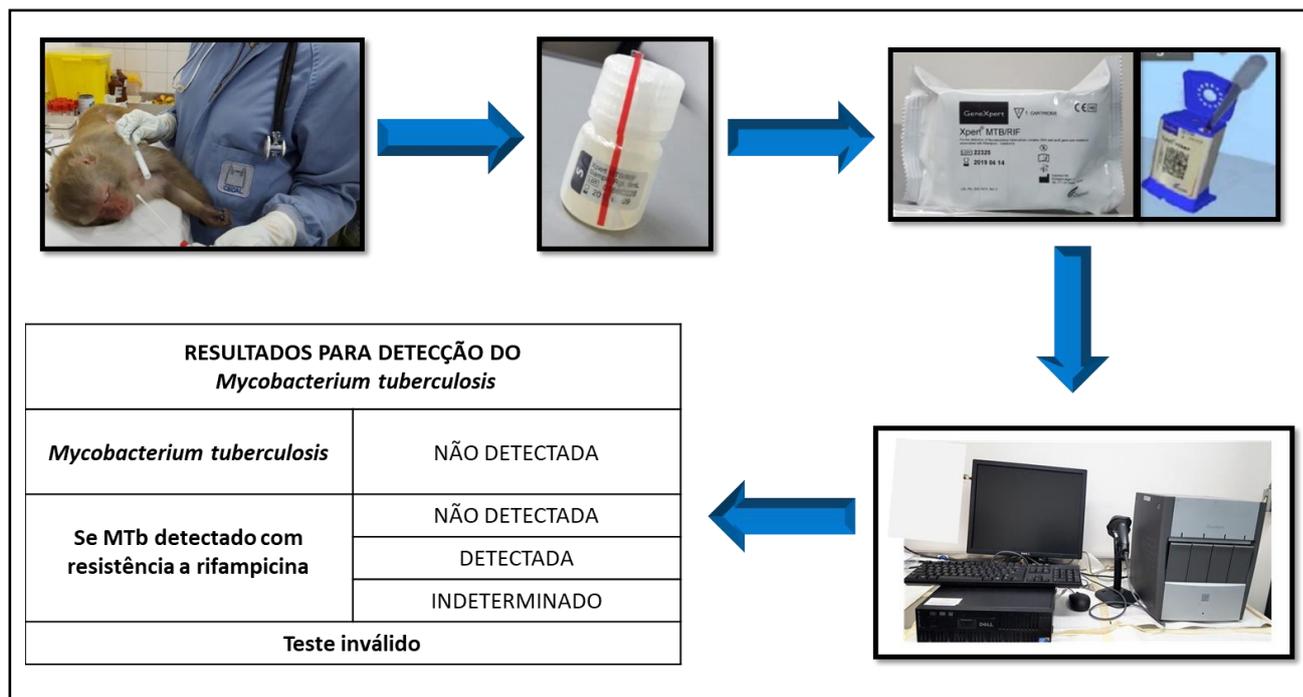


Figura 6.30: Etapas da realização do teste na plataforma GenExpert®. Fonte: Laine Wilma do Nascimento.

Quanto aos estudos patológicos, as amostras de lesões coletadas sugestivas de TB são processadas para histopatologia e citologia. Para histopatologia, os fragmentos são conservados em solução de formol 10% tamponado para serem clivados, processados e incluídos (Figura 6.31).

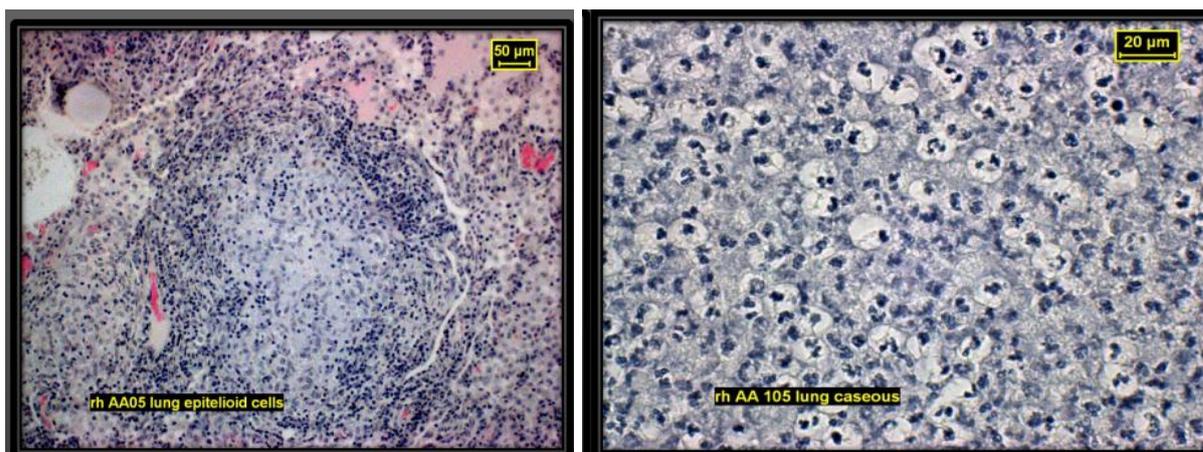


Figura 6.31: Lesões histológicas de parênquima pulmonar de macaco rhesus (*M. mulatta*). Fonte: ICTB-Fiocruz.

O final deste capítulo sintetiza de modo esquemático o fluxo laboratorial de rastreabilidade do Mtb (Figura 6.32).

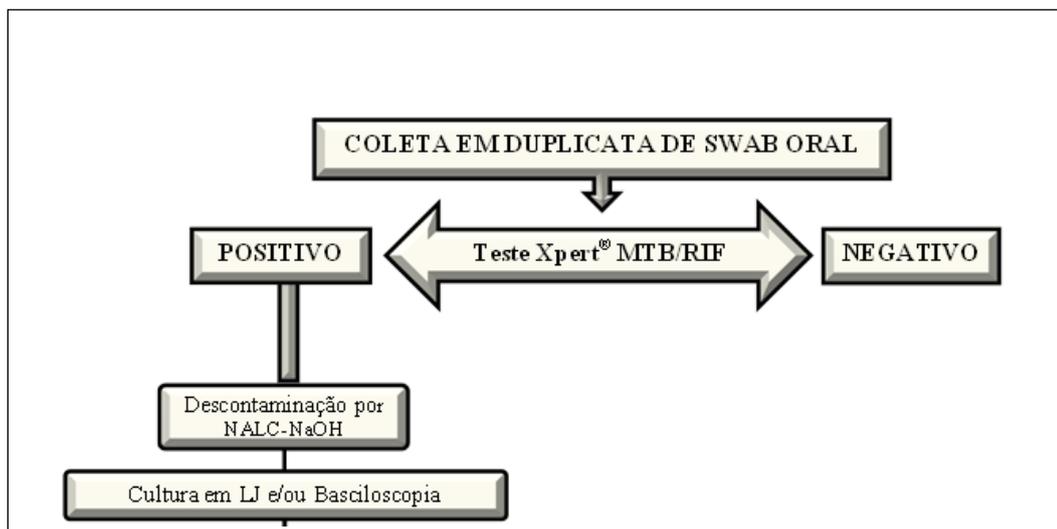


Figura 6.32: Fluxo laboratorial para rastreamento do Mtb.

Espera-se que o leitor possa fazer uso dos esclarecimentos dispostos neste capítulo como ferramenta de escolha de diagnóstico e como base para execução de tais procedimentos.

6.6. Capítulo 6: Fluxos de rastreabilidade do bacilo da tuberculose em criações de primatas não humanos

O somatório de conhecimentos acumulado pelos profissionais envolvidos, no surto identificado a partir de 2011 nas criações de PNH do ICTB, engloba áreas multidisciplinares no combate à TB, possibilitando dispor de ampla orientação técnica quanto a um programa de controle sanitário a ser adotado no âmbito institucional, com esquematização por fluxos de mapeamento do bacilo. Os cuidados a serem tomados a partir desta endemia são destacados no capítulo 6, mostrando a dinâmica dos processos de trabalho.

Desta forma, este capítulo baseou-se em todos os procedimentos detalhados nos capítulos anteriores. Foram elaborados fluxogramas pelo software Bizagi

Modeler™ (2016), que consiste em um programa construído para modelagem de processos com exposição em forma de fluxogramas. Mostra de forma esquemática todas as práticas voltadas para a medicina preventiva, manejo de PNH, processamento de amostras biológicas e destinação de resíduos e carcaças:

- i) Identificação de TB nos profissionais envolvidos (Figura 6.33);
- ii) Acesso controlado às colônias de primatas (Figura 6.34);
- iii) Procedimentos de manejo animal na identificação do CMtb (Figura 6.35);
- iv) Leitura do teste tuberculínico de PNH (Figura 6.36);
- v) Processamento laboratorial das amostras biológicas (Figura 6.37);
- vi) Rastreabilidade do bacilo da TB em uma criação com suspeita de surto (Figura 6.38);
- vii) Rotina dos estudos patológicos para pesquisa de TB (Figura 6.39);
- viii) Descarte de carcaças (Figura 6.40).

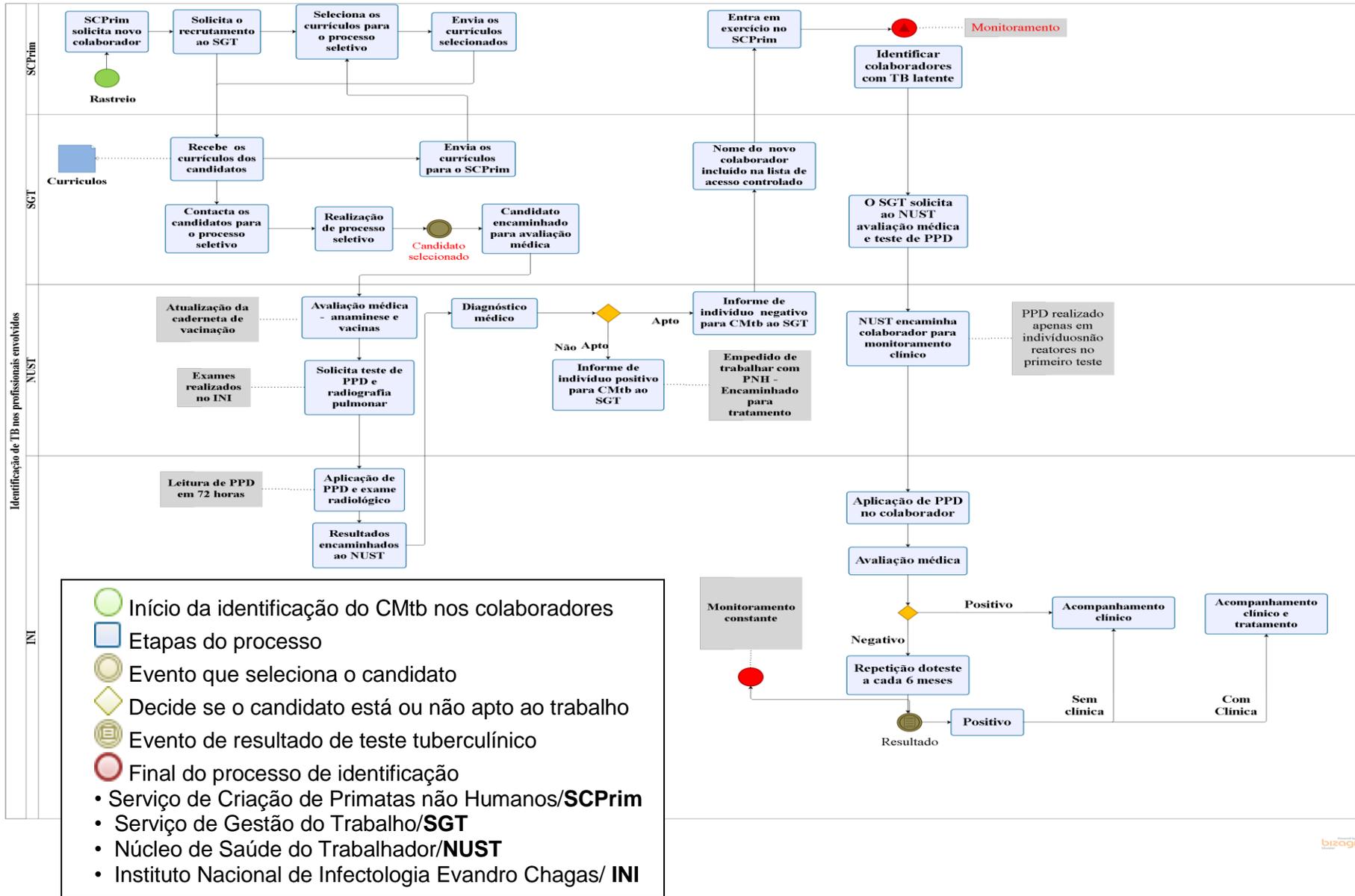


Figura 6.33: Identificação de TB nos profissionais envolvidos.

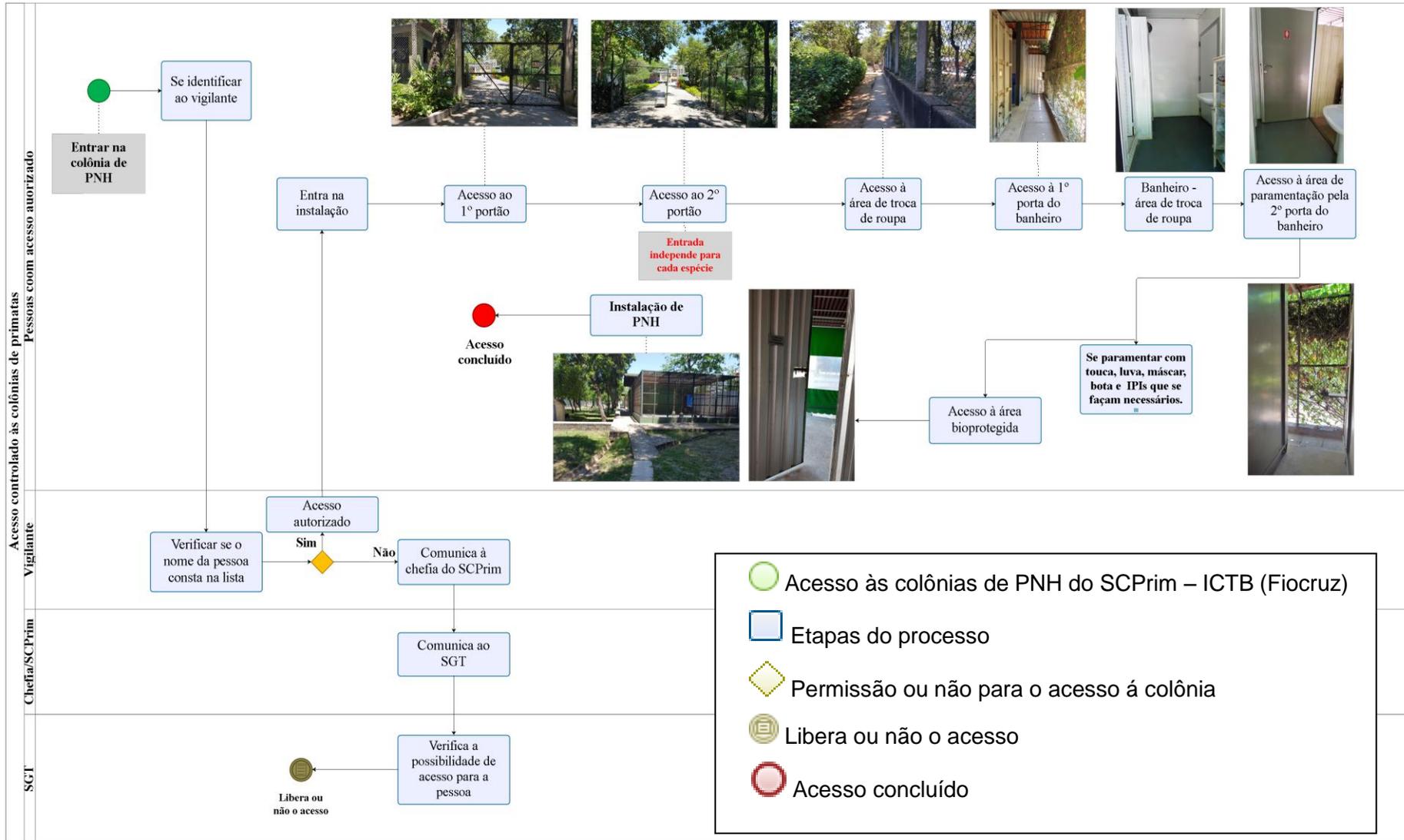


Figura 6.34: Acesso controlado nas colônias de primatas.

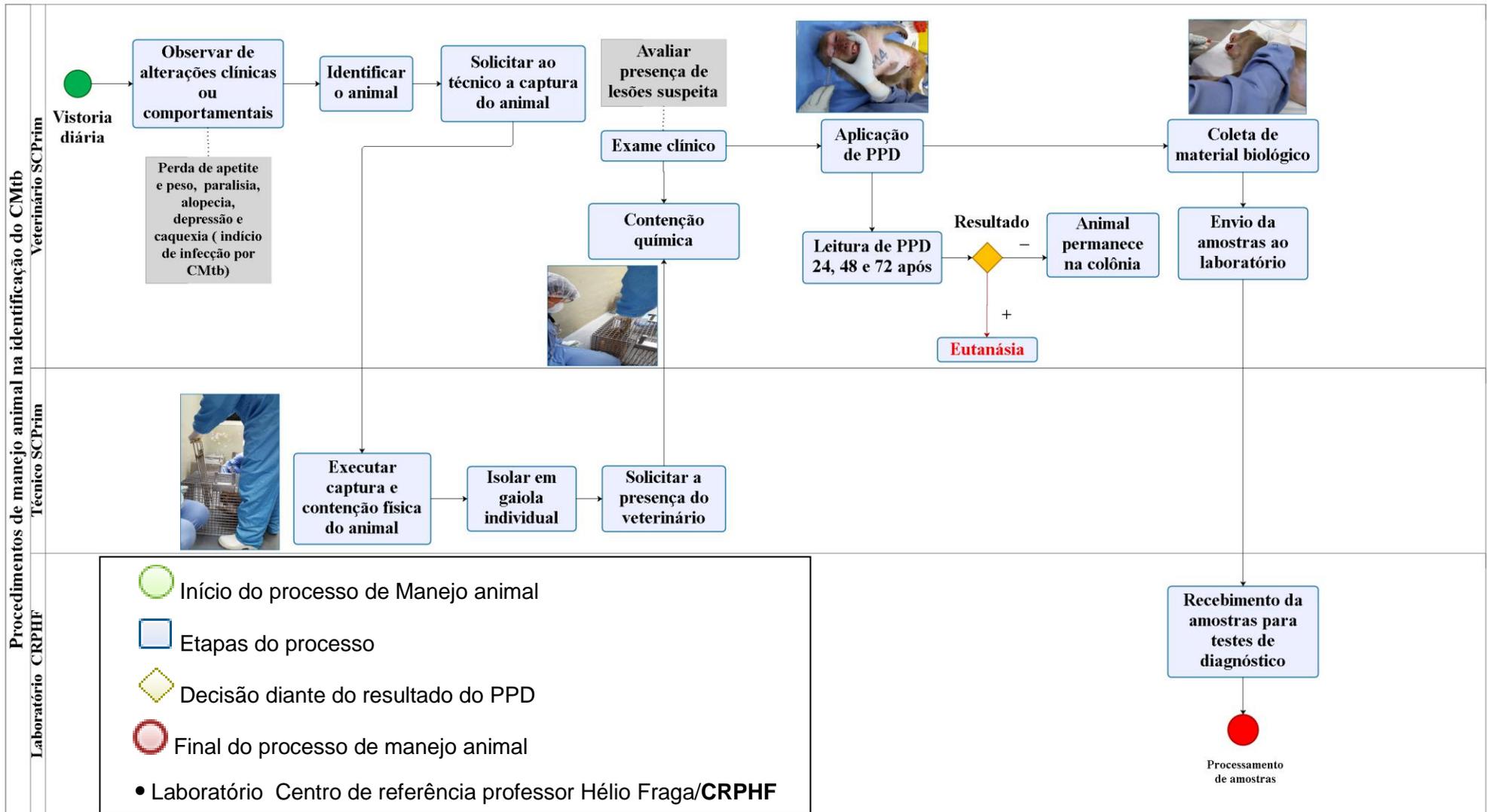


Figura 6.35: Procedimentos de manejo animal para identificação do CMtb.

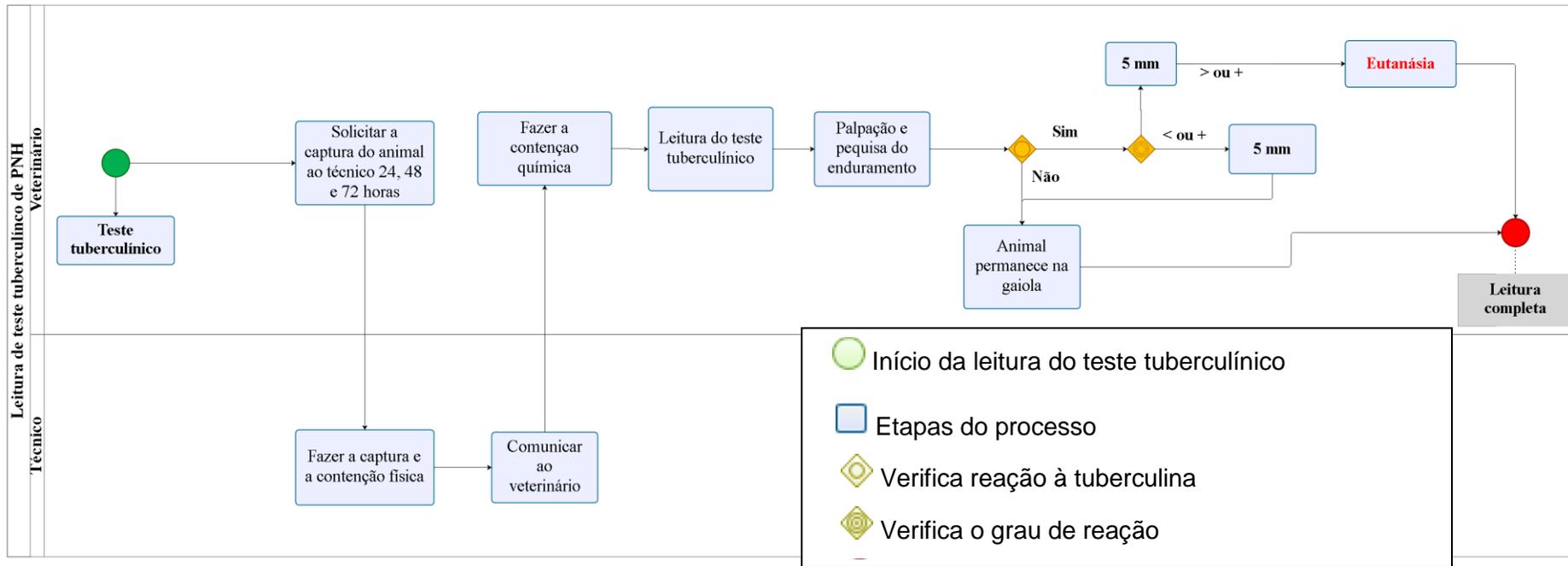


Figura 6.36: Leitura do teste tuberculínico de PNH.

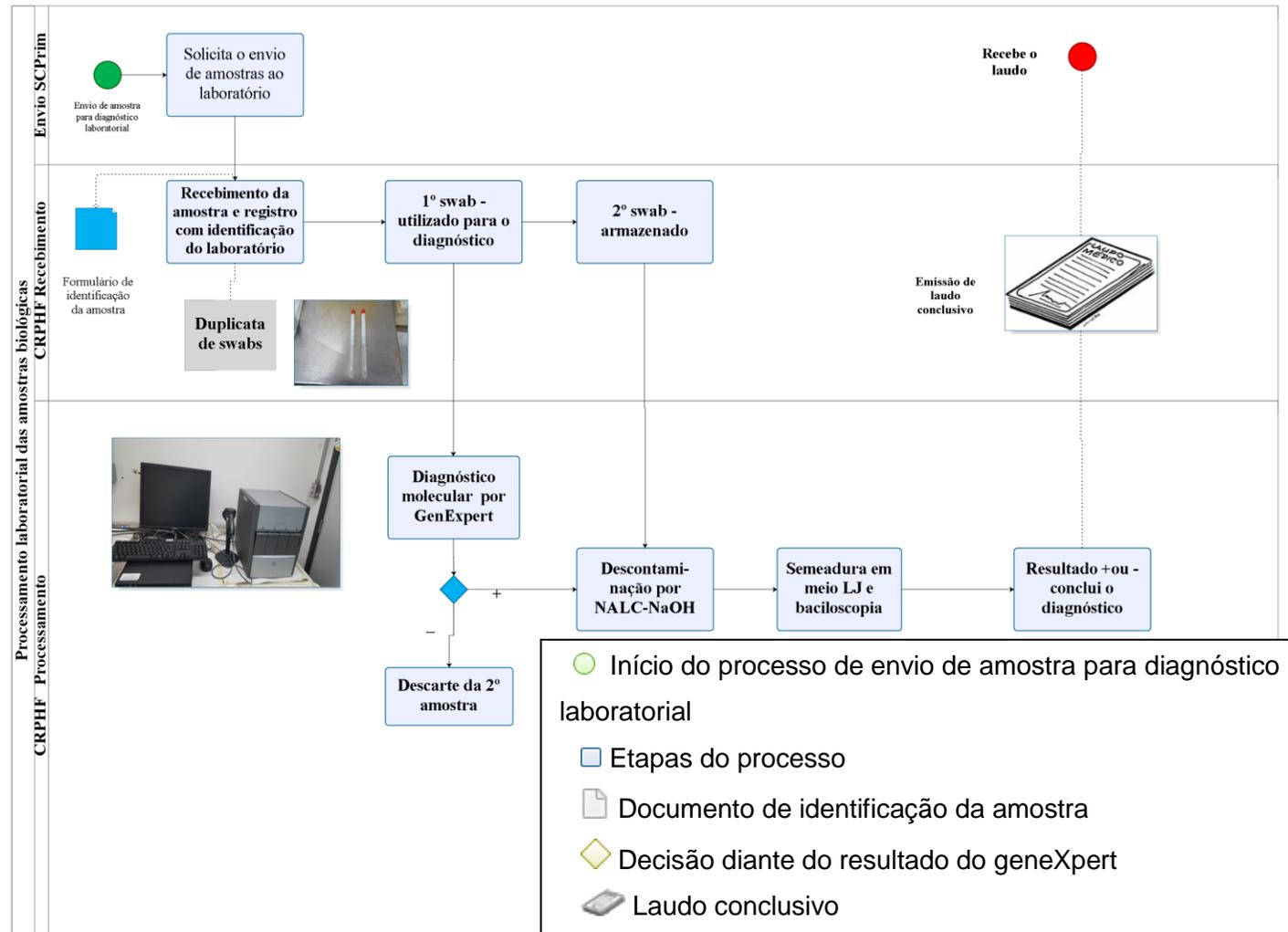


Figura 6.37: Processamento laboratorial de amostras biológicas.

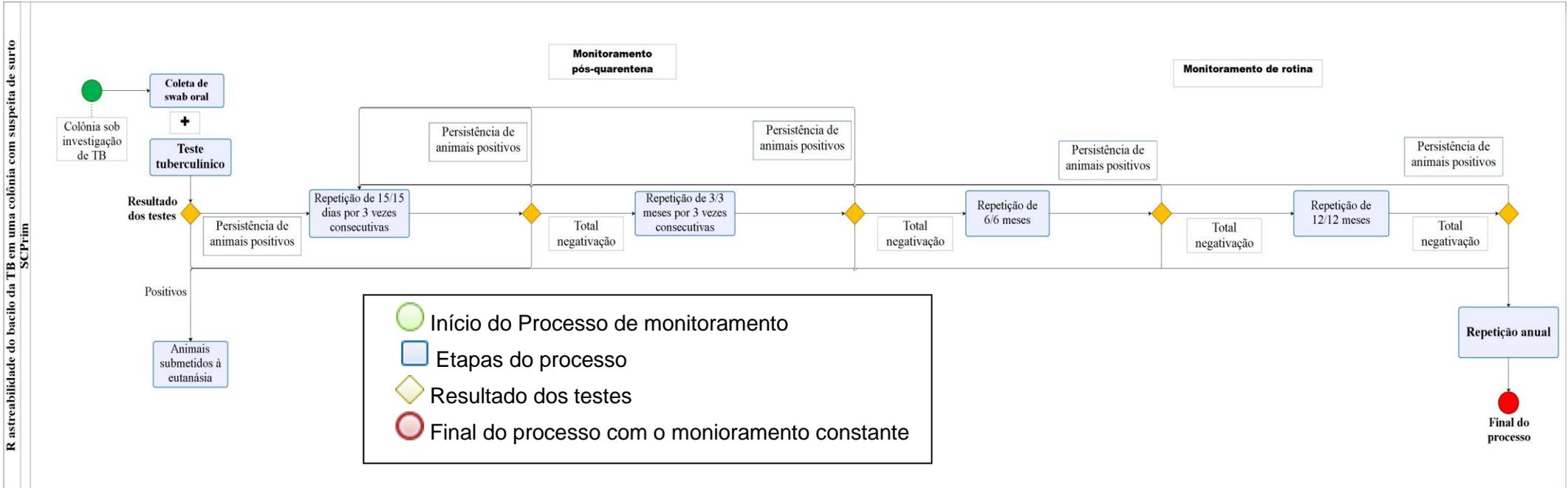


Figura 6.38: Rastreabilidade do bacilo da TB em uma criação com suspeita de surto.

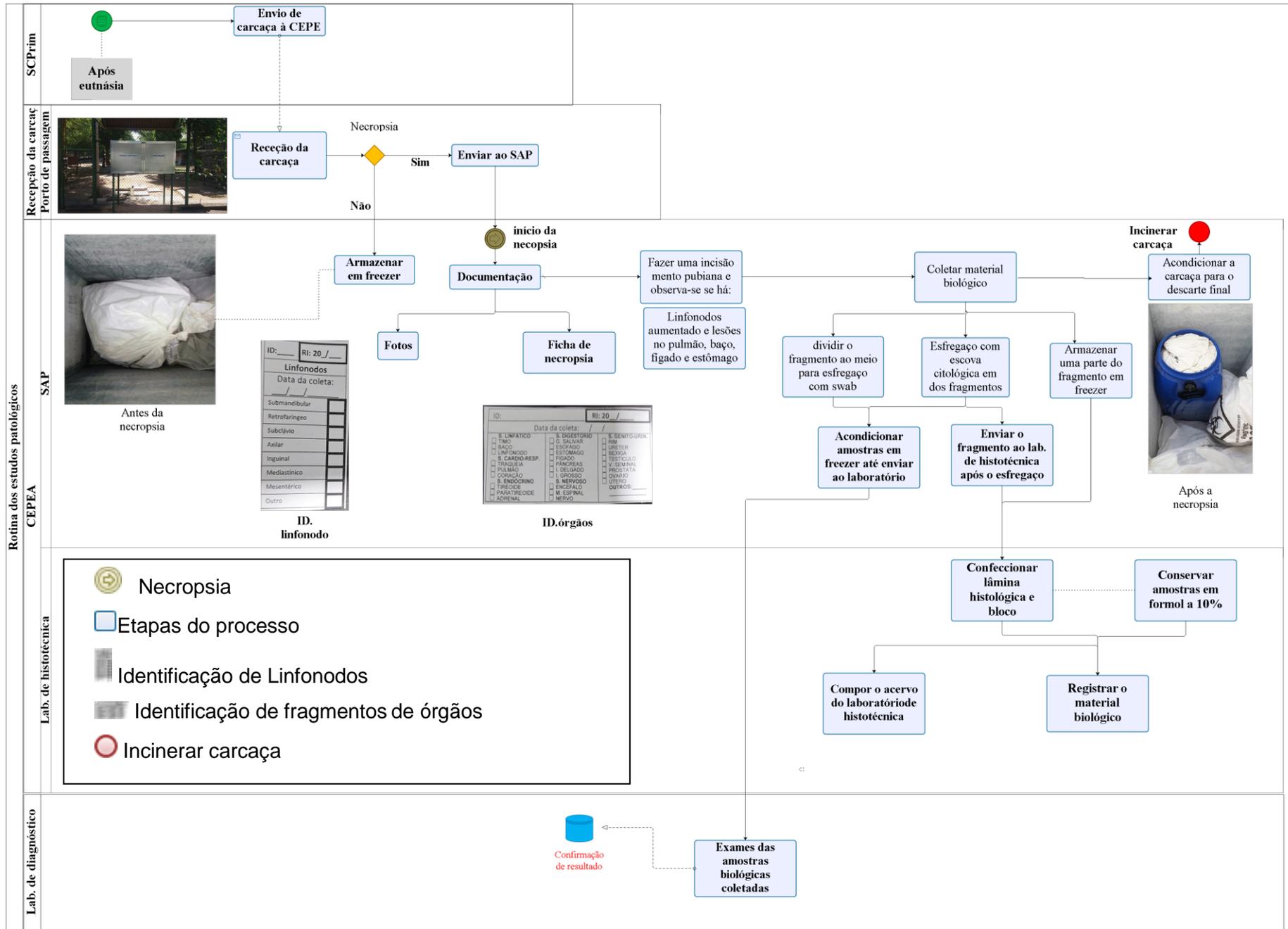


Figura 6.39: Rotina dos estudos patológicos para pesquisa de TB.

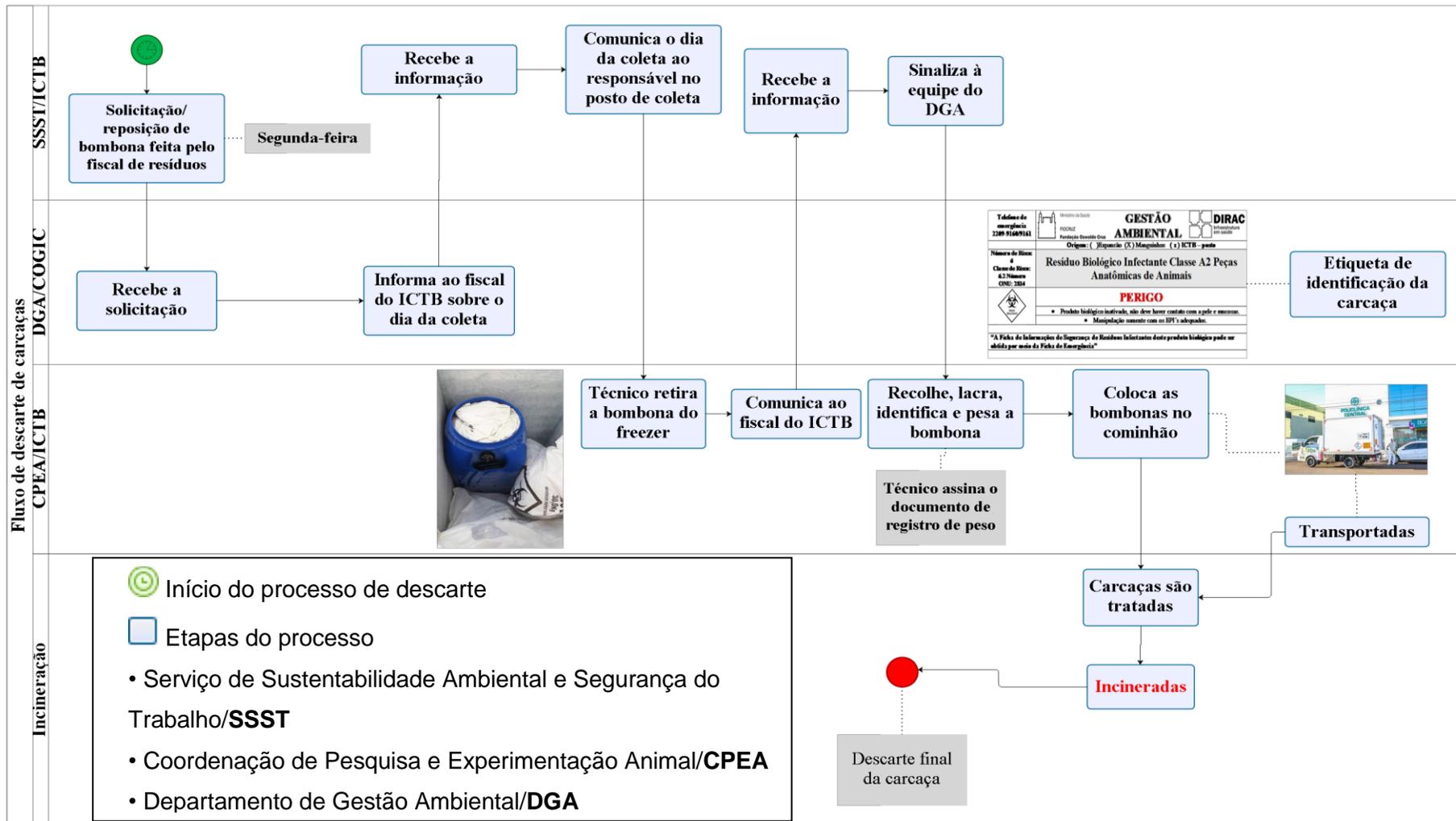


Figura 6.40: Descarte de carcaças.

6.7. Capítulo 7: Perspectivas e desafios: é possível garantir proteção a criações de primatas quando o bacilo da tuberculose representa ameaça contínua?

São muitos os méritos deste manual, que finaliza suas ideias no capítulo 7 com perspectivas e desafios, formulando a pergunta: “é possível garantir proteção a criações de primatas quando o bacilo da TB representa ameaça contínua?” Tal tópico relata estratégias de proteção contra o bacilo da TB, idealizadas pelo grupo de profissionais que buscam animais de qualidade em termos de biossegurança, controle sanitário e bem-estar. A seguir são descritos planejamentos estratégicos a serem considerados:

- i) transferência das criações para região afastada dos centros urbanos;
- ii) preservação do patrimônio genético e reprodução assistida;
- iii) imunização;
- iv) tratamento da TB em primatas.

6.8. Considerações Finais

E por fim, o manual apresenta as considerações finais, com a assertiva de que o modelo organizacional exposto neste compêndio predomina amplamente a praticidade dos temas abordados quanto às atividades de rotina que os profissionais devem lidar ao se defrontar com um surto de TB em uma população de primatas, configurando-se um excelente recurso de consulta técnico-científica.

Este manual está sendo analisado para publicação na Editora Fiocruz.

7. DISCUSSÃO

Uma vez que a taxa de incidência de TB é elevada no entorno do campus da Fiocruz, existe um forte indício de que a rede de comunidades do Complexo de Manguinhos seja a fonte principal de contaminação que culminou no surto ocorrido na colônia de PNH da Fiocruz.

Quando se trata de criadouro científico de primatas destinados a pesquisas, é importante que os mesmos sejam mantidos em ambientes controlados, livres de vetores e reservatórios que possam comprometer a saúde dos animais de laboratório, ocasionando, inclusive, um desequilíbrio do ciclo silvestre natural e consequente perda da biodiversidade (AFN, 2013). Os PNH procedentes do criadouro científico da Fiocruz se encontram alojados em ambientes abertos, o que facilita a transmissão por aerossóis potencialmente contaminados, enfatizando também que estes são animais altamente sensíveis ao bacilo.

Ademais, a partir do momento em que se identificam indivíduos suspeitos de TB em um grupo social, estes devem ser encaminhados para uma área diferenciada (de isolamento) e permanecer reclusos até a confirmação do resultado (BUSHMITZ et al., 2009). Quando não existe uma estrutura separada para isolamento, é interessante que os técnicos se organizem de modo que executem as atividades do manejo diário, primeiramente, na área considerada "limpa" e depois prossigam para os trabalhos na "área suja". Em virtude da ausência de espaço, o criadouro da Fiocruz não possui um local específico para isolamento/quarentena. A solução para esta limitação foi dada ao separar as equipes de profissionais que atuam de forma independente nas diferentes colônias símias.

Assim, em consonância com a legislação pertinente quanto aos critérios de indicação para eutanásia de animais reagentes aos testes de diagnóstico para TB (MCTI, 2013, BRASIL, 2013), aliados à falta de um local de isolamento, a Fiocruz adota o processo de eutanásia dos animais quando são positivos ou suspeitos, visto que representam uma ameaça à saúde pública.

Na busca do controle da TB na população de primatas e no ambiente, a equipe técnica composta por colaboradores da Fiocruz, programou um conjunto de medidas para evitar a propagação do agente: - intervenção do Núcleo de Saúde do Trabalhador (NUST-Fiocruz) quanto aos exames periódicos e programa de

identificação de pacientes com TB latente; - uso de EPIs, incluindo a máscara PFF2; - rodízio de desinfetantes nos recintos e dos equipamentos; - pedilúvio na entrada dos recintos; - poda drástica das árvores para aumentar a incidência de luz solar e diminuição da umidade; - construção de anteparos que separam as colônias para evitar a contaminação cruzada; - controle de acesso de pessoas às criações. Tais ações estão de acordo com as recomendações preestabelecidas (BRASIL, 2006; BUSHMITZ et al., 2009; GUILLEN, 2012; BRASIL, 2011).

De fato, após todas as condutas estabelecidas desde 2011, quando o primeiro caso de TB foi identificado na criação, observou-se que o número de eutanásias vem reduzindo ao longo dos anos (Figura 12). Os resultados indicam que as medidas de controle adotadas estão sendo eficazes.

Outra medida de controle importante é a técnica de condicionamento animal. Segundo o *International guidelines for the acquisition, care and breeding of nonhuman primates* (IPS, 2007), o animal deve permanecer contido pelo menor tempo possível. O condicionamento animal deve ser utilizado para treinar primatas a cooperar quando houver necessidade de contínuos procedimentos de captura (NC3Rs, 2006). A equipe do SCPrim (ICTB-Fiocruz) tem priorizado este procedimento, a fim de facilitar o manejo com os animais e, assim, evitar a contaminação por acidentes no momento da contenção para exames clínicos e coletas de amostras biológicas.

Atenção especial deve ser dada às pessoas que trabalham com tais animais, devendo receber acompanhamento por meio de exames de saúde periódicos anuais que atestem sua boa saúde. Pessoas com clínica compatível à TB devem ser imediatamente encaminhadas para o atendimento médico e caso a doença seja confirmada o funcionário deverá ser afastado para tratamento (BUSHMITZ et al., 2009). Atualmente existe um controle maior dos colaboradores do criadouro da Fiocruz quanto aos exames periódicos, pois o NUST-Fiocruz e o Instituto Nacional de Infectologia (INI-Fiocruz) atuam efetivamente nesta triagem do bacilo. Esta integração se mostra eficaz, uma vez que até o momento não foi identificado nenhum indivíduo acometido.

A literatura afirma que, em geral, os primatas cativos do Velho Mundo são mais sensíveis à TB do que os do Novo Mundo (MONTALI; MIKOTA; CHENG, 2001). Em oposição a esta assertiva, no surto deflagrado no criadouro da Fiocruz,

observou-se que os macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp.) são tão sensíveis quanto os macacos rhesus (*Macaca mulatta*).

A maioria dos primatas apresenta um quadro assintomático da TB, fato que dificulta a avaliação clínica e consequente manejo. Deste modo, a associação de métodos de diagnósticos em casos de surtos de primatas torna-se fundamental (ROBERTS; ANDREWS, 2008). Neste intuito, o SCPrim da Fiocruz vem adotando a associação de teste tuberculínico com técnicas moleculares, bacteriológicas e patológicas, empregadas em forma de parceria entre o ICTB-Fiocruz e o CRPHF (ENSP-Fiocruz).

Os estudos patológicos são considerados primordiais em um programa de vigilância da TB *post-mortem*. Assim, o serviço de necropsia associado com outras técnicas, contribui na exclusão do agente infeccioso em uma criação de PNH (FOX; COHEN; LOEW, 2002). Imbuído neste princípio, o ICTB-Fiocruz investiu na adequação das instalações do serviço de anatomia patológica, aumentando o nível de biossegurança, a fim de aprimorar a investigação dos patógenos de uma forma geral.

Quanto às técnicas moleculares, a plataforma do GeneXpert[®] MTB/RIF emite um resultado em até duas horas (BRATS, 2011) e vem sendo adotada para o diagnóstico de TB nos PNH da Fiocruz como triagem confiável e sensível (ALVES DA SILVA et al., 2017). Segundo Alves da Silva e colaboradores (2017), esta é uma tecnologia útil em centros de criação animal, zoológicos e outras instituições onde os humanos têm contato com primatas, caso a intenção seja associar um método alternativo rápido para o diagnóstico de TB nestes animais. É válido ressaltar que a técnica de Xpert[®] MTB/RIF feita a partir de amostras de esfregaço de mucosa oral de primatas é uma inovação no Brasil, com resultados promissores.

Em relação à destinação de resíduos biológicos e carcaças, destaca-se que o bacilo da TB presente nos resíduos de serviços de saúde é capaz de permanecer no ambiente por cerca de 150-180 dias (GARCIA; ZANETTI-RAMOS, 2004). Desta forma, toda instituição deve seguir o plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (PGRSS). Para tanto, os resíduos devem, inicialmente, ser submetidos a tratamento antes da disposição final e acondicionado de maneira compatível com o processo de tratamento a ser utilizado (ANVISA, 2004). A Fiocruz adota um fluxo de descarte de resíduos biológicos e de carcaças de PNH de acordo com a preconização da RDC 306 (ANVISA, 2004).

8. CONCLUSÕES

A compilação das informações técnicas dispostas no manual elaborado a partir da experiência vivenciada com o surto de TB na criação de PNH do criadouro científico do SCPrim (ICTB-Fiocruz), permitiu concluir que:

- I. Os recintos abertos dos PNH procedentes do criadouro científico da Fiocruz facilitam a contaminação pelo bacilo da TB e os inquéritos epidemiológicos mostram que as comunidades localizadas no entorno do campus da instituição pode ser a principal fonte de contaminação dos animais.
- II. A falta de uma área de isolamento propicia o carreamento do patógeno entre as colônias símias por contaminação cruzada.
- III. A redução dos resultados positivos de TB nos animais mostra que as ações de controle da TB que vêm sendo adotadas na unidade são eficientes.
- IV. O programa de identificação de TB nos colaboradores do ICTB-Fiocruz está sendo eficaz na triagem do bacilo.
- V. A elaboração dos "fluxos de rastreabilidade do bacilo da TB em criações de primatas não humanos" permitiu dispor de uma visualização abrangente de todas as ações executadas no criadouro científico estudado.
- VI. O uso da associação de métodos de diagnóstico tem se mostrado dinâmico na pesquisa do bacilo da TB nas criações de PNH do ICTB-Fiocruz, especialmente pela adoção da tecnologia do sistema Xpert[®] MTB/RIF.
- VII. Os macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp.) desenvolvem a TB ativa com manifestação de quadro clínico semelhante aos primatas do Velho Mundo, apresentando sensibilidades semelhantes.

9. REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. M. **Tuberculose Humana Causada pelo *Mycobacterium bovis*: Considerações Gerais e a Importância dos Reservatórios Animais**. 1998. 328 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)–Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- AFN, AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. Tuberculose. Favelas e periferias do Rio de Janeiro sofrem com a tuberculose, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/favelas-e-periferias-do-rio-de-janeiro-sofrem-com-tuberculose>>. Acesso em: 15 set. de 2017.
- AIRES, C. A. M; ARAUJO, C. F. M; NOBRE, M. L; RUSAK, L. A; ASSIS, U. G. Biossegurança em transporte de material biológico no âmbito nacional: um guia breve. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 73–81, 2015.
- ALFONSO, R; ROMERO, R. E; DIAZ, A; CALDERON, M. N; URDANETA, G; ARCE, J; POTARROYO, M. E; POTARROYO, M. A. Isolation and identification of mycobacteria in New World primates maintained in captivity. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3–4, p. 285–295, 2004.
- ALVES DA SILVA, D. **Análise imunogênica da proteína recombinante aspartil aminopeptidase (rv0800) de *Mycobacterium tuberculosis***. Tese (doutorado)–Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2014.
- ALVES DA SILVA, D; REGO, A. M; FERREIRA, N. V; ANDRADE, M. A. S; CAMPELO, A. R; CALDAS, P. C. S; PEREIRA, M, A. S; REDNER, P; PINA, L. C; RESENDE, F. C; PISSINATTI T.A; LOPES, C. A. A; KUGELMEIER, T; PEREA, J. A. S; SOUZA, I. V; SILVA, F. A; CAMPOS, C. F; FANDINHO MONTE, F. C. O; ANTUNES A, L. C. M. Detection of mycobacterial infection in non-human primates using the Xpert MTB/RIF molecular assay. **Tuberculosis**. v. 107, p. 59–62, 2017.
- AMORIM, E. G. **QuantiFERON-TB gold no diagnóstico da tuberculose**. Disponível em: <www.hermespardini.com.br>. Acesso em: 20 mar. 2017.
- ANDERSEN, P; MUNK, M. E; POLLOCK, J. M; DOHERTY, T. M. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. **Lancet**. v. 356, n. 9235, p. 1099–1104, 2000.
- ANDRADE, A; ANDRADE, M. C. R; MARINHO, A. M; FILHO, J. F. **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2010.
- ANDRADE, A; OLIVEIRA, R, S; PINTO, S. C. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2006.

ANDRADE, M. C. R. Primatas não humanos para estudos biomédicos: manejo, agentes infecciosos e monitoramento sanitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 5, n. 1, p. 64–75, 2017.

ANDRADE, M. C. R.; LEITE, J. P. G.; CABELLO, P. H. Frequency of the major histocompatibility complex *Mamu-A*01* allele in a closed breeding colony of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) from Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v. 38, n. 1, p. 39–41, 2009.

ANDRADE, M. C. R; RIBEIRO, C. T; SILVA, V. F; MOLINARO, E. M; GONÇALVES, M. A. B; MARQUES, M. A. P; CABELLO, P. H; LEITE, J. P. G. Biologic data of *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, and *Saimiri sciureus* used for research at the Fiocruz primate center. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 581–589, 2004.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC Nº 306. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília, DF: 2004.

AREND, S. M; ENGELHARD, A. C. F; GROOT, G; BOER, K; ANDERSEN, P; OTTENHOFF, T. H. M; VAN DISSEL, J. T. V. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1089–1096, 2001.

AREND, S. Repeatedly negative tuberculin skin tests followed by active tuberculosis in an immunocompetent individual. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 58, n. 2, p. 76–81, 2001.

BAKKER, D. **Diagnostic methods for tuberculosis: the absence of a perfect test.** European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV) Seventh Scientific Meeting, Leipzig. **Anais...**Germany: 2008.

BIZAGE MODELER: Software para organização de diagramas. Versão 3.1.0.011. [S.l]: Bizagi Time to Digital, 2016.

BLISCHAK, J. D; TAILLEUX, L; MITRANO, A; BARREIRO, L. B; GILAD, Y. Mycobacterial infection induces a specific human innate immune response. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias.** 1. Ed. Brasília, DF: 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT): manual técnico.** Brasília, DF: 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 13, 2016.a

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL/CONCEA. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 4: Primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino e pesquisa científica**. Brasília, DF: 2016.b

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Entendendo o sistema único de saúde/SUS**. Brasília, DF: 2013. Disponível em: <WWW.URL:http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=136>. Acesso: em 27 de set. de 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, DF: 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 8, 2017.

BRATS, BOLETIM BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE. Xpert® Mtb/rif no diagnóstico da tuberculose pulmonar. In: TRONCOSO, G. C.; PETRAMALE, C. A.; OLIVEIRA, M. R.; ELIAS, F. T. S., 2011. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/periodicos/brats_16.pdf>. Acesso em: 21 de out. de 2017.

BUSHMITZ, M; LECU, A; VERRECK. F; PREUSSING, E; RENSING, S; KERSTIN; MÄTZ-RENSING, K. Guidelines for the prevention and control of tuberculosis in non-human primates: recommendations of the European Primate Veterinary Association Working Group on Tuberculosis. **Journal of Medical Primatology**, v. 38, n. 1, p. 59–69, 2009.

BUTLER, W. R.; HAAS, W. H.; CRAWFORD, J. T. Automated DNA fingerprinting Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using fluorescent detection of PCR products. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1801–1803, 1996.

CAMPOS H. S. Diagnóstico da tuberculose the diagnosis of tuberculosis. **Pulmão**, v.15, n.2, p.92-99, 2006.

CARRERO, V. P. **Filosofia, historia e sociologia das ciências I: abordagens contemporâneas**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1998.

CHOI, E. W; LEE, K. W; KIM, T. M; PARK, H; JEON, M. R; CHO, C. W; PARK, J. B; KIM, S. *Mycobacterium tuberculosis* infections in cynomolgus monkey transplant

recipients and institution of a screening program for the prevention and control of tuberculosis. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2016.

COHEN, J; KRISHNAMOORTHY, G.; WRIGHT, A. M. Corporate governance and the audit process. **Contemporary Accounting Research**, v. 19, n. 4, p. 573–594, 2002.

DE SOUZA FIGUEIREDO, E. E; SILVA, M. G; FONSECA, L. S; SILVA, J. T; PASCHOALIN, V. M. F. Detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* no leite pela reação em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição do fragmento amplificado (PRA). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1023–1033, 2008.

DILLEHAY, D. L.; HUERKAMP, M. J. Tuberculosis in a tuberculin-negative rhesus monkey (*Macaca mulatta*) on chemoprophylaxis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 21, n. 4, p. 480–484, 1990.

ENARSON, D. A.; CHRETIEN, J. Epidemiology of respiratory infectious diseases. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 5, n. 3, p. 128–135, maio 1999.

EUZEBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: www.bacterio.net/mycobacterium.html. Acesso em: 16 de mar. de 2018.

FELASA, FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS. Revision of guidelines for health monitoring of non-human primates. **Laboratory Animal Science**, v.3, p.18, 1999. Suplemento.

FINKELSTEIN, L.; HOPKINS, M. L. TB or not TB? how to interpret a skin test. **The American Journal of Nursing**, v. 96, n. 12, p. 12–13, 1996.

FLYNN, J. L ; GIDEON, H. P; MATTILA, J. T; LING LIN, P. L. Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 60–73, 2015.

FLYNN, J; CAPUANO, S. V; CROIX, D; PAWAR, S; MYERS, A; ZINOVIK, A; KLEIN, E. Non-human primates: a model for tuberculosis research. **Tuberculosis**, v. 83, n. 1–3, p. 116–118, 2003.

FOX, J. G; COHEN, B. J; LOEW, F. M. (eds). **Laboratory Animal Medicine**. 2. ed. Orlando, Fla: Academic Press, 2002.

GARCIA M. A; YEE J; BOULEY D. M; MOORHEAD R; LERCHE N. W. Diagnosis of tuberculosis in macaques, using whole-blood in vitro interferon-gamma (PRIMAGAM) testing. **Comparative Medicine**, v. 54, n. 1, p. 86–92, 2004.

GARCIA, L. P.; ZANETTI-RAMOS, B. G. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 744–752, 2004.

GUILLEN, J. FELASA guidelines and recommendations. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 311–321, 2012.

HENRICH, M; MOSER, I; WEISS, A; REINACHER, M. Multiple Granulomas in Three Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*) Caused by *Mycobacterium microti*. **Journal of Comparative Pathology**. V. 137, P. 245-248, 2007.

HIJJAR, M. A.; OLIVEIRA, M. J, P. R; M. TEIXEIRA, G. A Tuberculose no Brasil e no mundo. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 2, 2001.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Aglomerados subnormais: Informações Territoriais, 2010. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/aglomerados_subnormais_informacoes_territoriais/default_informacoes_territoriais.shtm>. Acesso em: 03 de mar. de 2018.

IPS, INTERNATIONAL PRIMATOLOGICAL SOCIETY. **International guidelines for the acquisition, care and breeding of nonhuman primates**. 2 ed. USA, 2007. Disponível em:< <http://www.internationalprimatologicalsociety.org/publications.cfm>>. Acesso em: 22 de Out. de 2017.

JANEWAY, C. A. J; TRAVERS, P; WALPORT, M. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 5. ed. New York: Garland Science, 2001.
KAUFMANN, A. F. A program for surveillance of nonhuman primate disease. **Laboratory Animal Science**, v. 21, n. 6, p. 1061–1067, 1971.

LEATHERS, C. W; HAMM, T. E. Naturally occurring tuberculosis in a squirrel monkey and a cebus monkey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n. 9, p. 909-911, 1976.

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

LECU, A.; SASCHA, K.; FRANZ-JOSEF, K. **Tuberculosis in Nonhuman Primates, - an Overview of Diagnostic Tools**. In: SYMPOSIUM ON THE ISSUES OF TUBERCULOSIS FOR PRIMATE HUSBANDRIES WAS ORGANIZED AT THE GERMAN PRIMATE CENTER. German Primate Center: 2008. Disponível em: <http://www.dpz.eu/fileadmin/content/Infektionspathologie/Bilder/Dokumente/LECU%20TuberculosisFORMAT%20COP_Korr.pdf>. Acesso em: 27 de jan. de 2018

LEINER, S.; MAYS, M. Diagnosing latent and active pulmonary tuberculosis: a review for clinicians. **The Nurse Practitioner**, v. 21, n. 2, p. 91–92, 1996.

LERCHE, N. W; YEE, J. L; CAPUANO, S. V; FLYNN, J. L. New approaches to tuberculosis surveillance in nonhuman primates. **ILAR Journal**, v. 49, n. 2, p. 170–178, 2008.

LIN, P. L; YEE, J; KLEIN, E; LERCHE, N. W. Immunological concepts in tuberculosis diagnostics for non-human primates: a review. **Journal of Medical Primatology**, v. 37, p. 44–51, 2008.

LOPES, C. A. Clínica Aplicada. In: ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FERREIRA-FILHO, J (eds.). **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomedical**. Fiocruz: Rio de Janeiro, 2010.

MÄTTZ-RESING, K; HARTMANN, T; WENDEL, G. M; FRICK, J.S; HOMOLKA, S; RICHTER, E; MUNK, M. H; KAUP, F. –J. Outbreak of tuberculosis in a colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) after possible indirect contact with a human TB patient. **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, p 81-91, 2015.

MCIT, MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Portaria nº 596. Aprova as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília, DF, 2013.

MELO, F. A. F; AFIUNE, J. B. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. v. 19, n. 1, p. 19–24, 1993.

MONTALI, R. J.; MIKOTA, S. K.; CHENG, L. I. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. **Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 20, n. 1, p. 291–303, abr. 2001.

MUGISHA, L.; UNWIN, S. LANGHOUT, M. V. Z. Tuberculosis and its control. In: **PASA Primate Veterinary Healthcare Manual**, 2009.

MÜLLER, C. A. Biossegurança. In: ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FERREIRA-FILHO, J (eds.). **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Fiocruz: Rio de Janeiro, 2010.

NCR, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. The National Research Council's Committee on Toxicology The First 50 Years 1947-1997. Washington, DC: **The National Academies Press**, 1997.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.); ILAR, INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8 ed . Washington, D.C: National Academies Press, 2011.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Módulos de principios de epidemiologia para el control de enfermedades: control de enfermedades en la poblacion**. Washington, D.C: Organizacion Panamericana de la Salud, 2002.

PAI, M; RILEY, L. W; COLFORD JR, J. M. Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 12, p. 761–776, 2004. 96

PASA, PAN AFRICAN SANCTUARY ALLIANCE. Disease issues important to sanctuaries. In: **VETERINARY HEALTH MANUAL**. 2. ed. 2009.

PAYNE, K. S. *Mycobacterium tuberculosis* infection in a closed colony of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Journal of the American Association of Laboratory Animal Science**, v.50, n.1, p.105–108, 2011.

PHUAH, J. Y; MATTILA, J. Y; LIN, P. L; FLYNN, J. L. Activated B cells in the Granulomas of Nonhuman primates infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 2, 2012.

PINTO, M; ENTRINGER, A. P; STEFFEN, R; TRAJMAN, A. Cost analysis of nucleic acid amplification for diagnosing pulmonary tuberculosis, within the context of the Brazilian Unified Health Care System. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 6, p. 536–538, 2015.

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

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. **Boletim de pneumologia Imunitária** v. 9, n. 1, p. 35–59, jun. 2001.

RÜSCH-GERDES, S. Epidemiology of resistant tuberculosis in Europe. **Infection**, v. 27 Suppl 2, p. S17-18, 1999.

SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Canadian Veterinary Journal**, v. 24, p. 127–131, 1983.

SUZUKI, Y; MATSUBA, T; NAKAJIMA, C. Zoonotic aspects of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. **Kekkaku**, v. 85, n. 2, p. 79-86, 2010.

VAN RIE, A; MELLET, K.; JOHN, M-A.; SCOTT, L; PAGE-SHIPPI, L; DANSEY, H; VICTOR, T; WARREN, R. False-positive rifampicin resistance on Xpert® MTB/RIF: case report and clinical implications [Technical note]. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 2, p. 206–208, 2012.

VERVENNE, R. A. W; JONES, S. L; VANSOOLINGEN, D; TRIDIAVAN DER LAAN, T. VD; ANDERSEN, P; PETER HEIDT, P. J; ALAN WTHOMAS, A; LANGERMANS, J. A. M. TB diagnosis in non-human primates: comparison of two interferon- γ assays and the skin test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, n. 1–2, p. 61–71, 2004.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report**, 2016.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis**. Geneva: World Health Organization, 2011.

WILBUR, A. K.; ENGEL, G. A.; JONES-ENGEL, L. TB infection in the nonhuman primate biomedical model: Tip of the iceberg? **Medical Hypotheses**, v. 79, n. 3, p. 365–367, 2012.

WILBUR, A. K; ENGEL, G. A; ROMPIS, A; A PUTRA, I. G. A; LEE, B. P. Y. –H; AGGIMARANGSEE, N; CHALISE, M; SHAW, E; GUNWHA, OH; SCHILLACI, M. A; JONES-ENGEL, L. From the mouths of monkeys: detection of *Mycobacterium*

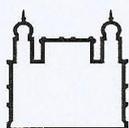
tuberculosis complex DNA from buccal swabs of synanthropic macaques. **American Journal of Primatology**, v. 74, n. 7, p. 676–686, 2012.

WOOD, R. C; LUABEYA, A. K; WEIGEL, K. M; WILBUR, A. K; JONES-ENGEL, L; HATHERILL, M; CANGELOSI, G. A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA on the oral mucosa of tuberculosis patients. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015.

ZUMLA, A; SQUIRE S. B; CHINTU C; GRANGE J. M. The tuberculosis pandemic: implications for health in the tropics. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 113–117, 1999.

10. ANEXO

10.1. Anexo A: Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-5/16

Certificamos que o protocolo (P-8/14.5), intitulado “**CRIAÇÃO, PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS NO CENTRO DE CRIAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO/CECAL PARA ATENDER AOS PROGRAMAS E PROJETOS DESENVOLVIDOS NA FIOCRUZ**”, sob a responsabilidade de **CARLA DE FREITAS CAMPOS** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Informamos que todos os animais encaminhados para experimento devem ser testados previamente para tuberculose e os proponentes deverão informar imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz o surgimento de animais positivos para a doença.

Esta licença tem validade até 29/02/2020 e inclui o uso total de:

Macaca mulatta

- 163 machos.
- 335 fêmeas.

Macaca fascicularis

- 19 machos.
- 39 fêmeas.

Saimiri sciureus

- 91 machos.
- 145 fêmeas.

Saimiri ustus

- 10 machos.
- 04 fêmeas.

Rio de Janeiro, 29 de fevereiro de 2016.


Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096