

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Rastreo de agentes zoonóticos bacterianos pela técnica de PCR

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Sérgio Bartolomeu dos Santos João

Orientadores: Prof^ª. Doutora Maria Manuela Outeiro Correia de Matos

Prof^ª. Doutora Ana Cláudia Correia Coelho



Vila Real, 2017

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Rastreo de agentes zoonóticos bacterianos pela técnica de PCR

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Sérgio Bartolomeu dos Santos João

Orientadores: Prof^ª. Doutora Maria Manuela Outeiro Correia de Matos

Prof^ª. Doutora Ana Cláudia Correia Coelho



Vila Real, 2017

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Rastreo de agentes zoonóticos bacterianos pela técnica de PCR

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Sérgio Bartolomeu dos Santos João

Orientadores: Prof^a. Doutora Maria Manuela Outeiro Correia de Matos

Prof^a. Doutora Ana Cláudia Correia Coelho

Composição do júri:

Vila Real, 2017

Este trabalho é uma obra original realizado para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia para as Ciências da Saúde.

Agradecimentos

Ao Magnífico Reitor da Universidade de Trás-os-Montes, Professor Catedrático António Fontainhas Fernandes agradeço a oportunidade e possibilidade de realizar este trabalho.

À Professora Doutora Manuela Matos, por aceitar ser minha orientadora de dissertação, pela orientação, disponibilidade e orientação nesta etapa. À Professora Doutora Ana Cláudia Coelho, pela ajuda, apoio e conhecimentos transmitidos.

À Doutora Sandra Martins, pelo incansável apoio e simpatia.

À minha família e amigos, pelo apoio moral, confiança e disponibilidade.

Resumo

As zoonoses são um tipo de doenças infecciosas que se transmitem entre animais e humanos. A tendência para passarem despercebidas potencia a ocorrência de surtos, ganhando um carácter de doenças emergentes e representando, muitas vezes, custos económicos e de saúde pública significativos.

A Nocardiose e a Tularémia são duas zoonoses emergentes. A primeira, provocada por *Nocardia* spp., é associada a infeções em sistemas imunitários deprimidos e potencialmente letal quando sistémica no organismo e não tratada. A segunda é provocada pela *Francisella* spp., uma bactéria altamente infecciosa, adaptada como arma biológica aerossolizada durante a segunda metade do século XX. O desenvolvimento de métodos de diagnóstico precisos é crucial na identificação destes agentes patogénicos, especialmente em animais selvagens, os quais funcionam como reservatórios destes agentes no meio natural. Isto traduz-se num melhor entendimento da abrangência e gravidade da infeção.

Neste estudo realizou-se um rastreio de *Nocardia* spp. e *Francisella* spp., em várias espécies de animais selvagens provenientes da Beira Interior Sul de Portugal, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para *Nocardia* spp., a análise envolveu 114 animais, com 206 amostras de tecidos de diferentes órgãos destes. Os resultados mostraram uma prevalência de infeção de 55,3% nos animais analisados, e 83 amostras de tecido foram positivas para esta bactéria. No caso de *Francisella* spp. foram analisados 79 animais e 130 amostras de tecidos destes. Os resultados apontaram para potenciais casos de infeção por esta bactéria em 20 dos animais analisados (25,3%) e em 18 dos tecidos estudados (13,8%). Em ambos os rastreios, os órgãos mais afectados foram os gânglios mesentéricos.

Em conclusão, salienta-se o sucesso da PCR na identificação de agentes infecciosos, revelando o elevado potencial zoonótico de *Nocardia* spp., pela porção significativa de animais infetados. Ainda, é de referir a necessidade de estudos para confirmar o potencial caso de *Francisella* spp., o qual se encontrou presente em diversas espécies com importância económica em Portugal.

Palavras-chave: animais selvagens; *Nocardia* spp.; *Francisella* spp.; PCR

Abstract

Zoonoses are one kind of infectious diseases, which are transmitted between animals and humans. Its tendency to go unnoticed potentiate the occurrence of outbreaks, raising its status to emergent diseases and frequently representing significant costs for the economy and public health.

Nocardiosis and Tularemia are two examples of emerging zoonoses. The first one, caused by *Nocardia* spp., is linked to infections in depressed immune systems, being potentially lethal if systemic and untreated. The second one is caused by *Francisella* spp., an highly infectious bacteria, which has been adapted as an aerosolized biological weapon during the second half of the twentieth century. The development of precise diagnostic methods is crucial in the identification of these pathogenic agents, particularly in wild animals, which serve as reservoirs in the wilderness areas. This results in a better understanding of the infection length and seriousness.

In this study, we performed an analysis, with Polimerase Chain Reaction (PCR), of *Nocardia* spp. and *Francisella* spp., in several species of wild animals from the southern region of Beira Interior, in Portugal. For *Nocardia* spp. this analysis involved 114 animals, with 206 tissue samples of different organs. The results showed for an animal infection prevalence of 55.3%, with 83 tissue samples being positive for this bacteria. In the case of *Francisella* spp., we analyzed 79 animals and 130 tissue samples. The results suggested several potential cases of infection by this bacteria in 20 of those animals (25.3%) and in 18 of the tissue samples used in this part (13.8%). In both parts, the most affected organs were the mesenteric lymph nodes

In conclusion, this study underlines the success of PCR methodologies in detecting of infectious agents, revealing the high zoonotic potencial of *Nocardia* spp., considering the significant portion of infected animals. Also, studies are necessary regarding the potential of *Francisella* spp., which was shown to be presented in several economically relevant species, in Portugal.

Keywords: wild animals; *Nocardia* spp.; *Francisella* spp.; PCR

Índice

1.Introdução.....	1
2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia.....	3
2.1.Nocardiose.....	3
2.1.1.Etiologia.....	4
2.1.1.1.O género <i>Nocardia</i>	4
2.1.1.1.1.Classificação.....	4
2.1.1.1.2.Características gerais.....	4
2.1.2.Epidemiologia.....	5
2.1.2.1.Espécies suscetíveis.....	5
2.1.2.2.Fatores de risco.....	6
2.1.2.3.Transmissão.....	6
2.1.2.4.Prevalência e distribuição mundial.....	6
2.1.3.Patogenia.....	8
2.1.4.Quadro clínico e lesional.....	8
2.1.5.Diagnóstico.....	9
2.1.6.Tratamento e prevenção.....	10
2.1.7.Potencial zoonótico.....	10
2.2.Tularémia.....	11
2.2.1.Etiologia.....	11
2.2.1.1.O género <i>Francisella</i>	11
2.2.1.1.1.Classificação.....	11
2.2.1.1.2.Características gerais.....	12
2.2.2.Epidemiologia.....	13
2.2.2.1.Espécies suscetíveis.....	13
2.2.2.2.Fatores de risco.....	13
2.2.2.3.Transmissão.....	14

2.2.2.4.Prevalência e distribuição mundial.....	14
2.2.3.Patogenia	15
2.2.4.Quadro clinico e lesional	17
2.2.5.Diagnóstico.....	17
2.2.6.Prevenção e tratamento.....	18
2.2.7.Potencial zoonótico	19
3.Objetivos.....	21
4.Material e métodos	23
4.1.Amostras.....	23
4.2.Extração de DNA a partir de tecidos	23
4.3.Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase e detecção.....	24
4.3.1. <i>Nocardia</i> spp.	25
4.3.2. <i>Francisella</i> spp.	26
4.4.Electroforese em gel de agarose	27
4.5.Visualização do gel e análise dos dados.....	27
5.Resultados.....	29
5.1. <i>Nocardia</i> spp.	29
5.2. <i>Francisella</i> spp.	33
6.Discussão.....	37
6.1. <i>Nocardia</i> spp.	37
6.2. <i>Francisella</i> spp.	39
7.Conclusões.....	41
8.Bibliografia.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1: Lista dos animais utilizados para coleta das amostras.	23
Tabela 2: Descrição da mistura de reação de PCR.	25
Tabela 3: Descrição da sequência dos “primers”.	25
Tabela 4: Descrição das condições de ciclos e temperaturas de reação da PCR.	25
Tabela 5: Descrição da mistura de reação de PCR.	26
Tabela 6: Descrição da sequência dos “primers”.	26
Tabela 7: Descrição dos parâmetros de reação da PCR.	27
Tabela 8: Distribuição de <i>Nocardia</i> spp. por famílias taxonômicas e espécies em animais selvagens recolhidos e examinados entre 2009 e 2013.	30
Tabela 9: Distribuição dos resultados positivos na PCR em 206 amostras de tecidos de 114 mamíferos selvagens.	31
Tabela 10: Distribuição dos resultados positivos da PCR em amostras com lesões observadas nos 114 mamíferos selvagens.	32
Tabela 11: Frequência de animais nas diferentes categorias de resultados testados.	32
Tabela 12: Frequência e ocorrência de <i>Nocardia</i> spp., em casos confirmados, por idade e sexo.	33
Tabela 13: Localização geográfica (por concelho) dos casos comprovados de infecção por <i>Nocardia</i> spp.	33
Tabela 14: Potenciais casos de <i>Francisella</i> spp. detetados, por famílias taxonômicas e espécies em animais selvagens recolhidos e examinados entre 2009 e 2013.	35
Tabela 15: Distribuição dos resultados positivos na PCR em 130 amostras de tecidos de 79 mamíferos selvagens.	35
Tabela 16: Distribuição dos resultados da PCR em amostras com lesões observadas nos 79 animais selvagens.	36
Tabela 17: Frequência e ocorrência de casos potenciais de <i>Francisella</i> spp., por idade e sexo.	36
Tabela 18: Localização geográfica (por concelho) dos casos potenciais de <i>Francisella</i> spp.	36

Índice de Figuras

Figura 1: Coloração de Gram de <i>Nocardia</i> spp.....	5
Figura 2: Colónias de <i>Nocardia</i> em meio gelose-sangue	9
Figura 3: Filogenia do género <i>Francisella</i> com base nas sequências dos genes ribossomais da subunidade 16S.....	12
Figura 4: Zonas endémicas de <i>F. tularensis</i> (a cinzento)	15
Figura 5: Gel de agarose após amplificação por PCR, para deteção de <i>Nocardia</i> spp., demonstrando a banda de 596 bps.....	29
Figura 6: Gel de agarose após amplificação por PCR, para detecção de <i>Francisella</i> spp., expondo a banda de 300 pb, aproximadamente.....	34

Lista de Abreviaturas

BCYEA – Agar enriquecido com extracto de levedura (do inglês “Buffered Charcoal Yeast Extract Agar”)

CDC – do inglês “Centers for Disease Control and Prevention”

CEVDI/INSA - Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

CFSPH – do inglês “Center for Food Security and Public Health”

Cfu – Unidades Formadoras de Colónias (do inglês “Colony forming units”)

DNA – Ácido Desixirribonucleico (do inglês “deoxyribonucleic acid”)

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”)

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)

FCP – Fagossoma que contém *Francisella* (do inglês “*Francisella*-containing phagosome”)

FDA – do inglês “Food and Drug Administration”

FPI – Ilha de patogenicidade de *Francisella* (do inglês “*Francisella* Pathogenicity Island”)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês “Human Immunodeficiency Virus”)

LPS – Lipopolisacarídeo (do inglês “Lipopolysaccharide”)

MALDI-TOF – Espectrometria de massa por Ionização e Dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo (do inglês “Matrix-assisted laser desorption/ionization with time of flight mass spectrometry”)

meso-DAP – Ácido meso-diaminopimélico (do inglês “meso-diaminopimelic Acid”)

NADPH – Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotina e Adenina (do inglês “Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate”)

NCBI – do inglês “National Center for Biotechnology Information”

Pbs – Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês “Polymerase Chain Reaction”)

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (do inglês “restriction fragment length polymorphism”)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês “Ribonucleic Acid”)

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês “Reactive Oxygen Species”)

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal (do inglês “Ribossomal Ribonucleic Acid”)

1.Introdução

As zoonoses são doenças transmitidas entre animais e humanos, através de artrópodes vetores, do consumo de produtos contaminados ou do contato, direto ou indireto com o agente etiológico. Embora se encontrem, ocasionalmente, subestimadas ou negligenciadas, estas doenças apresentam, na sua generalidade, uma distribuição global, com taxas de incidência, de prevalência e de mortalidade variáveis (Chikeka and Dumler, 2015). Como grupo predominante das doenças infecciosas emergentes, as zoonoses, especialmente as de origem em animais selvagens, acarretam prejuízos avultados para a saúde pública e a economia (Jones *et al.*, 2008).

A inclusão da pastorícia e da agricultura nas sociedades pré-civilizacionais favoreceu a circulação de organismos patogénicos, entre hospedeiros (animais que transportam o agente) e humanos, propiciando uma quantidade sem precedentes de elos de interacção entre agentes patogénicos, humanos, animais domesticados e animais selvagens (Pearce-Duvel, 2006). Consequentemente, a multiplicidade de agentes infecciosos com possibilidade de se disseminar a espécies domesticadas é análoga à diversidade de espécies selvagens com importância única no funcionamento do ecossistema, potenciando danos avultados às fontes de sustentabilidade de diversas comunidades (Bengis *et al.*, 2004).

Nos dias atuais, a aproximação entre as zonas residenciais e as regiões selvagens, em resultado da sobrepopulação a nível global, facilita a transmissão de agentes infecciosos, proporcionando a reemergência de diferentes zoonoses. Tal evento advém da ocorrência frequente de surtos, sem índices de morbidade e mortalidade significativos, os quais não são reportados ou detetados, fomentando a progressão para um surto epidémico em larga escala e com repercussões inéditas nas políticas de prevenção e saúde pública dessas zoonoses (Meslin *et al.*, 2000). Incidentes recentes, como a gripe aviária (H5N1), a doença do vírus de Lassa e a doença do vírus Ébola, despertaram a comunidade geral para os perigos das zoonoses com origem em animais selvagens, salientando a necessidade de conhecer a ecologia e epidemiologia dos agentes zoonóticos, de forma a desenvolver políticas de combate e prevenção eficazes (Murphy, 2008). Todavia, segundo Cutler *et al.* (2010), a emergência de um agente zoonótico pode ser estimulada por numerosos fatores. Entre estes, salientam-se os inerentes ao agente (natureza, mutações, persistência, etc.) e ao hospedeiro (susceptibilidade, exposição ao agente, atividades, habitat, etc.), bem como as informações na literatura acerca do agente e da sua dinâmica de interação, a qual,

1.Introdução

quando incipiente, promove exposições evitáveis ao agente e dificulta o seu diagnóstico e tratamento. Em virtude destes fatores, a implementação de tais políticas requerem a superação de vários obstáculos, devido à relativa imprevisibilidade quanto à natureza, origem e impacto resultante do aparecimento de um novo agente zoonótico, mesmo recorrendo a modelos matemáticos apropriados.

Posto isto, é comum que a generalidade das políticas de prevenção a zoonoses assente na monitorização e vigilância das mesmas. No entanto, a carência de diagnósticos apropriados e eficazes, perpetua a incompreensão deste tipo de doença, até que a ocorrência de um surto generalizado capte a atenção da comunidade. Finalizando, os alicerces de uma política de prevenção adequada, devem-se basear na distribuição do agente pelos animais selvagens reservatórios, nos seus habitats naturais, e na presença de vetores conhecidos, permitindo a delimitação de zonas de perigo de infeção acrescida, e restringir a disseminação do agente (Childs and Gordon, 2009).

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

2.1.Nocardiose

A nocardiose é uma zoonose que cursa de forma granulomatosa, sendo provocada por várias estirpes do género *Nocardia*. Em 1888, na Ilha da Guadalupe, Edmond Nocard (1850 – 1903), veterinário e microbiologista francês, isolou uma bactéria filamentosa aeróbia em bovinos que apresentavam sinais clínicos de farcinose bovina (Nocard, 1888), a qual seria denominada de *Nocardia farcinica* em 1889 (Bergey *et al.*, 1989). No mesmo ano, uma bactéria similar foi isolada pela primeira vez, por Eppinger, numa amostra de um abscesso cerebral fatal, proveniente de um paciente humano. Em 1896, foi-lhe atribuído o nome de *Nocardia asteroides* (Blanchard, 1896), levantando a controvérsia com a equívoca *Nocardia farcinica*, associada a uma doença frequentemente provocada por *Mycobacterium*. Desta forma, *N. asteroides* foi convencionado como o modelo de espécie para o género *Nocardia* (Gordon, 1981).

Até recentemente, a nocardiose, era considerada uma doença oportunista rara e uma curiosidade clínica (Rodrigues *et al.*, 2009). Isto justificava-se pelo amplo e comum conjunto de sintomas, tanto em indivíduos saudáveis como imunodeprimidos, e por uma relativa carência de relatórios médicos, resultantes do diagnóstico custoso e pouco específico, e da consequente baixa suspeita da presença do agente por parte dos clínicos (Corti and Villafane-Fioti, 2003). Em humanos, esta doença associa-se frequentemente a doentes com disfunções imunitárias, como indivíduos HIV positivos, doentes em tratamento prolongado com corticosteroides, e recetores de órgãos transplantados. Para estes indivíduos, a ausência de tratamento adequado para esta bactéria, favorece a infeção da pele e colonização dos pulmões, seguido da colonização do cérebro ou outros órgãos internos, tornando-se sistémica e potencialmente fatal (Abreu *et al.*, 2015).

O reportório em expansão de casos relatados de infeção por *Nocardia* spp. em animais domésticos ou selvagens relevantes para o consumo, e no próprio ser humano, tem contribuído para o estatuto desta zoonose emergente, para a qual o diagnóstico e tratamento ainda demonstram algum grau de ineficácia e demora nos resultados (Condas *et al.*, 2013).

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

2.1.1.Etiologia

2.1.1.1.O género *Nocardia*

2.1.1.1.1.Classificação

De acordo com o NCBI (National Center for Biotechnology Information) o género *Nocardia* inclui-se na família Nocardiaceae, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacteriales, classe Actinobacteria e filo Actinobactéria. Este género engloba-se nos actinomicetes aeróbios, tal como *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonea*, *Tsukamurella* e *Actinomadura* (McNeil and Brown, 1994). Salvo toda a controversa e inconstante definição das espécies pertencentes ao género *Nocardia* (Gordon, 1981), este englobava mais de 50 espécies caracterizadas no fim do século XX (Euzeby, 1997). Atualmente, existem mais de 100 espécies descritas de *Nocardia* (Betrán *et al.*, 2016). O recurso a técnicas moleculares, como amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e análises de padrões de restrição (Restriction Fragment Length Polymorfism, ou RFLP) do gene que codifica o RNA da subunidade 16 dos ribossomas (gene 16S rRNA), permitiram identificar e diferenciar com sucesso as diferentes espécies de *Nocardia* existentes na literatura, bem como descobrir espécies ainda não descritas (Conville *et al.*, 2000), colocando um termo à conturbada classificação destas bactéria. Atualmente, já foram referenciadas mais de 30 espécies de *Nocardia* com elevada significância clínica, predominantemente o complexo *N. nova*, o complexo *N. transvalensis*, *N. abscessus*, *N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica* e *N. brasiliensis* (Brown-Elliott *et al.*, 2006). Contudo, este número elevado de espécies de *Nocardia* descritas e caracterizadas, irá tendencialmente aumentar de forma continuada, contribuindo para uma maior heterogeneidade deste género em particular (Roth *et al.*, 2003).

2.1.1.1.2.Características gerais

As bactérias do género *Nocardia* têm uma forma de bacilo gram-positivo, aeróbio obrigatório, possuindo filamentos similares a hifas, quando observados ao microscópio (Wilson, 2012), como mostra a Figura 1. Estes filamentos são capazes de se fragmentarem em cocobacilos, facilitando a disseminação pelo organismo. A sua parede celular classifica-se como do tipo IV e é constituída por ácidos tubérculoesteáricos e ácidos micólicos de cadeia curta (40 a 60 carbonos), compartilhando, desta maneira, várias similaridades morfológicas com as bactérias do género *Mycobacterium*. O seu peptidoglicano é composto por arabinose, galactose e ácido *meso-*

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

diaminopimélico, ou meso – DAP (Saubolle and Sussland, 2003), composto envolvido na ativação de células epiteliais de vários tecidos humanos (Uehara *et al.*, 2006).

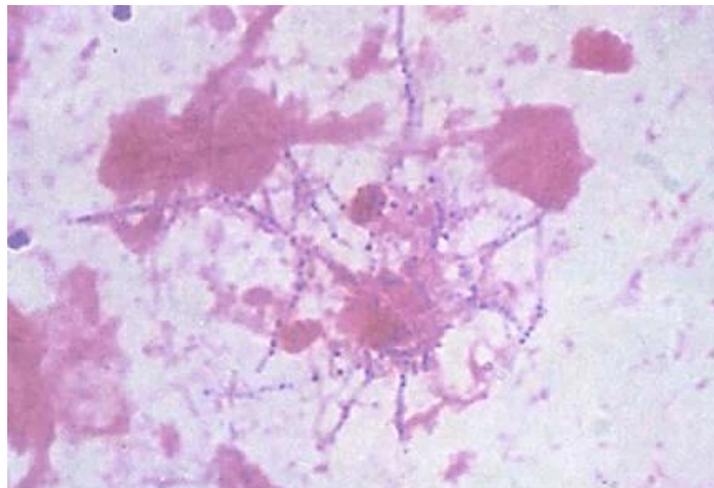


Figura 1: Coloração de Gram de *Nocardia* spp. (adaptado de Lerner, 1996).

2.1.2.Epidemiologia

2.1.2.1.Espécies suscetíveis

As espécies de *Nocardia* infetam um vasto leque de espécies. Entre estes, salientam-se espécies domesticadas, como cavalos (Biberstein *et al.*, 1985), ovinos (Emeruwa, 1986), caprinos (Maldonado *et al.*, 2004) e cães (Ribeiro *et al.*, 2008), espécies de animais selvagens, como cabras montesas (Domenis *et al.*, 2009), antílopes (Kinde *et al.*, 1992), tatus (Gezuele, 1972), cervídeos (Vemireddi *et al.*, 2007), peixes e mamíferos aquáticos (St-Leger *et al.*, 2009), alguns tipos de aves (Park and Jaensch, 2009), e crustáceos (Carella *et al.*, 2013).

Embora a transmissão direta entre humanos e animais ainda se encontre por registar, alguns novos *clusters* deste género de bactérias evidenciam esta possível ocorrência (Beaman and Sugar, 1983; McNeil and Brown, 1994). No Homem, as infeções por *Nocardia* spp. afetam principalmente indivíduos com o sistema imunitário comprometido, como recetores de transplantes e portadores de síndromes de insuficiência imunitária, apresentando elevada morbidade e mortalidade nos casos referidos (McNeil and Brown, 1994). Pode também causar várias infeções secundárias em indivíduos com cancro internados (Wang *et al.*, 2014). Para além destes, devido aos registos de infeção hospitalar, ou nosocomial, qualquer indivíduo que tenha de ficar internado por mais de uma semana torna-se um potencial portador de alguma isoforma de *Nocardia* (Kalpoe *et al.*, 2007).

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

2.1.2.2.Fatores de risco

Como doença oportunista, o maior fator de risco na nocardiose é o sistema imunitário comprometido ou suprimido, tornando infecções pelo vírus do HIV, ou outras doenças que afetem o sistema imunitário, um problema crucial (Mootsikapun *et al.*, 2005). Também a existência prévia de doenças crônicas, como a diabetes, fibrose cística, tuberculose e oftalmalgias, são fatores predisponentes para o desenvolvimento desta doença (Taj-Aldeen *et al.*, 2013). Outro fator crítico no desenvolvimento da doença é a administração de corticosteroides, pois a ação destes químicos, ainda que necessária no combate a diversas doenças, está estritamente relacionada com a supressão parcial do sistema imunitário, piorando o prognóstico de uma infecção por *Nocardia* (Yang *et al.*, 2014).

2.1.2.3.Transmissão

Segundo o Center for Disease Control and Prevention (CDC), é possível encontrar *Nocardia* spp. em solos e em ambientes aquáticos, a nível global. Nesta situação, ocorre transmissão por inalação ou por contato com cortes na pele e feridas abertas. No entanto têm surgido várias evidências de outros meios de transmissão. Entre estes, salientam-se produtos alimentares processados de origem animal, que podem ser reservatórios da bactéria, como o leite (Condas *et al.*, 2012), bem como o caso de uma transmissão vetorial em ambiente hospitalar, por meio da traça *Clogmia albipunctata*, já descrito na Alemanha (Faulde and Spiesberger, 2013). Para além do aparecimento destas bactérias em processos cirúrgicos e transplantes de órgãos, a transmissão nosocomial tem ganho maior relevância, devido ao aparecimento de estirpes semelhantes de *Nocardia* em doentes que estiveram hospitalizados em camas próximas, levantando a questão acerca da origem da transmissão: primária, por vetores, como referido anteriormente, ou secundária, a partir de um doente previamente infetado, remetendo para uma potencial transmissão de pessoa-a-pessoa (Saubolle and Sussland, 2003).

2.1.2.4.Prevalência e distribuição mundial

As isoformas do género *Nocardia* têm distribuição mundial, tendo sido descritas em animais terrestres e aquáticos.

A maioria de casos de nocardiose relatados está relacionada com infecções em pacientes imunodeprimidos. Um estudo realizado entre 1980 e 2014 demonstrou que *Nocardia* spp. ocupava uma posição de topo, como responsável, por casos de micetoma,

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

sendo descrita em pacientes provenientes de toda a Europa, desde Portugal até à Turquia (Buonfrate *et al.*, 2014). Em França, por exemplo, estimava-se, em 1992, que tivessem ocorrido entre 150 a 250 casos de nocardiose nos últimos cinco anos, particularmente infecções sistémicas por *N. asteroides* e por *N. farcinica*, a qual apresentava maior letalidade (Boiron *et al.*, 1992). Em Espanha, entre 1978 e 2001, a grande parte dos isolados de *Nocardia*, em humanos, pertenciam ao complexo *N. asteroides*, com colonização do sistema pulmonar, culminando na morte do paciente em mais de uma quarta parte dos casos (Pintado *et al.*, 2002). No panorama português, os relatórios evidenciam a elevada taxa de infeção em doentes com o sistema imunitário comprometido (Abreu *et al.*, 2015).

Na América do Norte, segundo o CDC, ocorrem entre 500 a 1000 novos casos de infeção por *Nocardia* spp., anualmente, maioritariamente associados a complicações prévias do sistema imunitário. Na América do Sul, os relatórios indicam que o número de casos tem também aumentado, estando a infeção associada aos problemas descritos para os países referidos anteriormente (Condas *et al.*, 2015). Quanto à situação na Austrália, a taxa de ocorrência referenciada é equiparável aos restantes países referidos, com o isolamento frequente da estirpe *N. asteroides* nos 102 casos clínicos reportados entre 1983 e 1988 (Georghiou and Blacklock, 1992).

Fora da perspetiva das infeções humanas, foram encontradas, pela primeira vez, estirpes de *Nocardia* spp. em javalis (*Sus scrofa*) e outros animais ungulados que compõem o roteiro nacional de caça (Matos *et al.*, 2015). No resto da Europa, o cenário assemelha-se ao nacional. Por exemplo, foi descrito na Holanda, um isolado inédito de *Nocardia* spp. em ostras, da espécie *Crassostrea gigas* (Engelsma *et al.*, 2008), reforçando a possibilidade de transmissão por ingestão de produtos contaminados.

Na Ásia, a situação repete-se, onde relatos provenientes de países como a Coreia, a Tailândia e outros, apontam para mais de uma centena de casos relatados entre 1982 e 2001 (Mootsikapun *et al.*, 2005; Wongthim *et al.*, 1991), bem como o aparecimento de novas estirpes, como *N. speluncae* em cavernas naturais (Seo *et al.*, 2007) e *N. harenae* nas areias de uma praia (Seo and Lee, 2006), no Japão. À semelhança deste último, foi encontrada uma nova espécie de *Nocardia*, designada por *N. ignorata*, em várias explorações petrolíferas do Kuwait (Rodríguez-Nava *et al.*, 2005).

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

2.1.3.Patogenia

Os mecanismos de patogênese de *Nocardia* spp. são complexos e requerem maior investigação. Independentemente da complexidade, estes mecanismos envolvem alguns eventos como evitar as propriedades antimicrobianas do hospedeiro, multiplicar-se dentro das células afetadas, ajustando o funcionamento destas de forma permanente (Beaman and Beaman, 1994). Em algumas estirpes, observaram-se diferentes tipos de colônias, das quais algumas possuíam deficiências na parede celular, encontrando-se associadas às lesões a longo prazo e persistência da infecção (Beaman and Scates, 1981).

A nocardiose caracteriza-se por uma resposta inflamatória aguda, seguida de necrose e formação de abscessos (Saubolle and Sussland, 2003). No entanto, o uso de corticosteroides e outros fármacos de aplicação prolongada encontram-se entre os principais fatores de risco, ao reduzir a atividade ou induzir a apoptose dos macrófagos e células-T CD4, contribuindo, desta forma, para a disseminação sistêmica da infecção (Abreu *et al.*, 2015). O desenvolvimento da doença encontra-se, ainda, associado à presença de antagonistas à TNF, uma citocina pro-inflamatória essencial à formação e manutenção de granulomas, durante a resposta inflamatória a agentes patogênicos intracelulares (Wallis *et al.*, 2004).

2.1.4.Quadro clínico e lesional

A infecção primária por *Nocardia* spp. apresenta frequentemente características de infecção pulmonar, em conjunto com um sistema imunitário deprimido, ou de infecção cutânea, associada, principalmente, à exposição ao nível profissional (Ambrosioni *et al.*, 2010).

Esta doença manifesta-se como infecção aguda, ou crônica após disseminação sistêmica, com sintomatologia inespecífica (Kandi, 2015). Os sintomas mais comuns são tosse com expectoração e febras altas, acompanhadas de linfocitopenia dos linfócitos T-CD4, e hipoalbuminemia (Li *et al.*, 2015).

A disseminação sistêmica da doença provoca inflamação do pericárdio e membrana sinovial (bacteriemia), empiema pulmonar e infecção de vários tecidos moles (Saubolle and Sussland, 2003). Por fim, tem-se observado em vários pacientes a ocorrência de dor pleurítica com sons pulmonares anormais e hemoptise, entre outras lesões torácicas, como cavitações e infiltrados intersticiais (Huang *et al.*, 2010).

Na perspectiva veterinária, os sinais clínicos mais manifestados envolvem tumefações cutâneas, abscessos e drenos na pele, acompanhados frequentemente de febre

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

e demonstrações de dor. Além destes, salientam-se a leucocitose, neutrofilia com presença de células leucocitárias imaturas, monocitose e hiperglobulinemia (Kirpensteijn and Fingland, 1992).

2.1.5.Diagnóstico

O diagnóstico da nocardiose está dependente de uma identificação precisa da bactéria (Tan *et al.*, 2010), dificultada pela cultura fastidiosa, pela semelhança de características com outras espécies e pela relativa incoerência taxonômica (Roth *et al.*, 2003).

Nocardia spp. cresce em meio Agar Gelose-Sangue, formando características colônias brancas, como observável na Figura 2. Esta bactéria cresce igualmente em meio Agar Sabouraud, meio Agar enriquecido com extrato de levedura (BCYEA) e meio Löwenstein-Jensen, com temperatura de crescimento preferencial entre 30°C e 37°C, demorando, aproximadamente, entre 48 horas a uma semana. Outra forma complementar de diagnóstico é a coloração de Ziehl-Neelson modificada, com 1% de ácido sulfúrico, na qual as bactérias são observadas como bacilos filamentosos cor-de-rosa (Kandi, 2015).



Figura 2: Colônias de *Nocardia* em meio gelose-sangue (adaptado de Arjun, Padmanabhan *et al.*, 2016).

A necessidade de um diagnóstico rápido para espécies bacterianas com crescimento lento e fastidioso, estimulou o desenvolvimento de diversas técnicas promissoras, maioritariamente fundamentadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Torres *et al.*, 1996). A PCR baseia-se na amplificação enzimática exponencial de um fragmento particular de DNA, de tamanho variável, mediado pela utilização de pares de “primers”. Um “primer” é um oligonucleótido, complementar a uma porção do

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

fragmento que se pretende amplificar. Este permite a ancoragem de uma polimerase termoestável, como a *Taq*, a qual replicará o fragmento alvo pela introdução sucessiva de deoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), até ao término do ciclo de amplificação, programado no termociclador utilizado. Desde a criação por Kary Mullis, em 1980, esta técnica tornou-se rotineira e automatizada na generalidade dos laboratórios, com diversas variantes desenvolvidas, como PCR – RFLP, PCR – Nested, RT – PCR, entre outros (Kolmodin and Birch, 2002). O recurso a estas técnicas moleculares de referência, como a amplificação do gene da subunidade 16S ribossomal (16S rDNA) por PCR, tem-se revelado um método mais preciso e rápido para identificar *Nocardia* spp. (Kandi, 2015). Outro exemplo de uma técnica molecular utilizada é o método PRA-hsp65, um perfil de restrição do gene codificante da proteína hsp65 (relacionada com a resposta ao choque térmico), cujas diferenças no padrão de bandas, em conjunto com aspetos morfológicos e de coloração do agente, permite distinguir diversas espécies deste género, de outros microrganismos, como *Mycobacterium* spp. (Muricy *et al.*, 2014).

2.1.6.Tratamento e prevenção

Como doença oportunista, a sua prevenção está associada à vigilância e prevenção dos diversos fatores de risco. À semelhança de outros actinomicetes, o tratamento da infeção por *Nocardia* spp. é executado recorrendo a elevadas doses de penicilina, por tempo prolongado. No entanto, para o caso particular de nocardiose pulmonar, em humanos, é habitual o uso de sulfonamidas, à exceção dos casos de *N. farcinica* e *N. otitidiscaviarum*, devido à sua resistência natural ao antibiótico (Yildiz and Doganay, 2006). Nestes casos, é recomendado o uso combinado de trimetoprim/sulfametoxazol, ceftriaxona, combinadas com outro antibiótico (Uhde *et al.*, 2010). Além disto, é sugerido uma adaptação do tratamento usado aos órgãos ou locais afetados, gravidade da infeção e com a presença de outras doenças que induzam suscetibilidade (Welsh *et al.*, 2013).

2.1.7.Potencial zoonótico

Devido ao seu diagnóstico controverso, as medidas e protocolos de controlo baseiam-se, largamente, na manutenção das condições de higiene e controlo dos produtos, não sendo específicas para esta bactéria (Ribeiro *et al.*, 2008). Como referido anteriormente, os *clusters* similares de bactérias encontrados em humanos e animais sugerem uma possível transmissão entre ambos (McNeil and Brown, 1994), enfatizando

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

o seu potencial zoonótico e salientando a necessidade de estudos comparativos entre estirpes isoladas em cada conjunto (Ribeiro *et al.*, 2008).

2.2. Tularémia

A Tularémia é uma doença zoonótica, potencialmente fatal, que afeta vários sistemas (Foley and Nieto, 2010). Esta é causada pela bactéria *Francisella tularensis*, utilizada como arma biológica, desde o século XIV AC, por civilizações como o Antigo Egito, os Hititas e outros (Trevisanato, 2007). O término da Guerra Fria atenuou a temática do uso de armas biológicas, diminuindo consideravelmente o interesse e investigação da Tularémia e do seu agente patogénico (Sjostedt, 2007), ainda que este último pertença ao grupo de elevado perigo (Tier 1) para a saúde pública e potencial uso como objeto de bioterrorismo, em conjunto com *Bacillus anthracis*, agente do Antrax, e *Yersinia pestis*, agente responsável pela Peste Negra (Cronquist, 2004).

De acordo com o CDC, a sua ocorrência natural é vagamente conhecida, pois grande parte dos casos passa, com alguma frequência, por reportar ou associar com a origem. Na Europa e no Médio Oriente a situação é semelhante, com vários autores a realçar o insuficiente conhecimento acerca dos mecanismos associados a esta doença e aos agentes implicados na propagação e infeção, complicando a prevenção e o desenvolvimento de uma vacina apropriada (Hestvik *et al.*, 2015). Embora um aumento da taxa de surtos de Tularémia por todo o Hemisfério Norte tenha instigado uma maior alerta e preocupação pela comunidade, esta doença é ainda considerada como pouco relevante pela Organização Mundial de Saúde (Oyston *et al.*, 2004).

2.2.1.Etiologia

2.2.1.1.O género *Francisella*

2.2.1.1.1.Classificação

Segundo o NCBI, o género *Francisella* pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Thiotrichales e família Francisellaceae. Este género engloba várias espécies, sendo *Francisella tularensis* a mais relevante.

Francisella tularensis, nomeada após o seu isolamento por Edward Francis, no condado de Tulare, Califórnia, no início do século XX, é o agente responsável pela Tularémia (Gurcan, 2007). Esta espécie engloba, presumivelmente, quatro grandes subespécies: *tularensis* (ou tipo A), *holarctica* (ou tipo B), *mediaasiatica* (Gurycova, 1998), e, com enorme contestação, *novicida*. As diversas subespécies foram diferenciadas, essencialmente, pela comparação da atividade da Citrulina ureidase, da

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

virulência, e da produção de ácido a partir do etanol, sendo a subespécie *tularensis* e a *holarctica* as mais virulentas (Petersen and Molins, 2010). Para além das diferenças medidas na atividade bioquímica, cada subespécie apresenta um genoma, distribuições e vias de transmissão sensivelmente diferentes, bem como uma variação genética considerável entre as mesmas (Johansson and Petersen, 2010). A filogenia desta bactéria apresenta-se parcialmente representada na Figura 3.

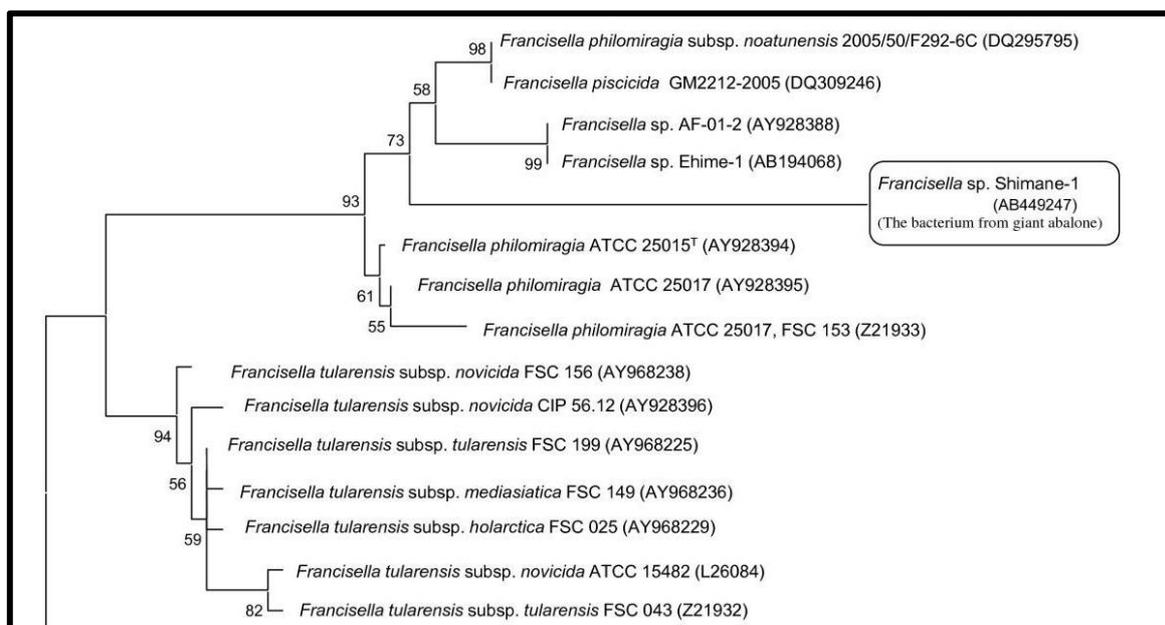


Figura 3: Filogenia do género *Francisella* com base nas sequências dos genes ribossomais da subunidade 16S, adaptado de Kamaishi *et al.*, 2005.

2.2.1.1.2. Características gerais

A bactéria *F. tularensis* é um parasita intracelular facultativo Gram-negativo, aeróbio, em forma de cocobacilo, que não apresenta mobilidade (Collins, 1996). A variante *F. tularensis tularensis* é extremamente infecciosa, estimando-se que um total de 10 bactérias, aerossolizadas, seriam suficiente para despoletar a doença. Este agente patogénico encontra-se normalmente envolto numa cápsula polissacarídea, de composição variável consoante o meio envolvente e associada à evasão ao sistema imunitário e à virulência (Rowe and Huntley, 2015).

Os resultados preliminares da sequenciação do genoma de *F. tularensis* estimaram um genoma com menos de 2 Mbp de tamanho e um teor de G+C relativamente baixo. Adicionalmente, cerca de 32% dos genes codificantes de proteínas não têm associação com outros genomas bacterianos, presentes nas bases de dados, revelando uma proporção sensivelmente elevada de genes específicos desta bactéria. (Prior *et al.*, 2001). Além do mencionado, a sequenciação do genoma forneceu

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

informações fundamentais acerca do metabolismo do organismo, denotando-se uma gama inédita de genes de virulência, associados aos *pili* e aos mecanismos de aquisição de ferro, e a perda de numerosas vias metabólicas, explicando os elevados requerimentos nutricionais e sugerindo a necessidade de infecção de hospedeiros para realizar o seu ciclo de vida (Larsson *et al.*, 2005). Com efeito, *F. tularensis* é capaz de infetar diferentes tipos de células, realizando parte do seu ciclo celular preferencialmente em macrófagos (Barel *et al.*, 2015).

2.2.2.Epidemiologia

2.2.2.1.Espécies suscetíveis

Francisella tularensis apresenta a capacidade de infetar um amplo número de vetores, como mosquitos (*Aedes cinereus*), carraças (*Dermacentor andersoni*), e moscas (*Chrysops spp.*), os quais facilitam a transmissão a um avultado conjunto de hospedeiros conhecidos. Destes últimos salientam-se diversos mamíferos, como o Homem (*Homo sapiens*), o coelho americano (*Sylvilagus spp.*), o coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*), a lebre (*Lepus spp.*), o castor (*Castor canadensis*), o veado-vermelho (*Cervus elaphus*) e o rato de água europeu (*Arvicola amphibius*), bem como, pássaros, peixes, anfíbios, (Birkbeck *et al.*, 2011; Morner, 1992; Petersen *et al.*, 2009). Um estudo realizado entre os anos 2010 e 2011, por Gyuranecz *et al.*(2011), evidenciou o papel da interação entre reservatórios durante períodos inter-zoonóticos, com especial atenção à relação entre a lebre e um tipo de carraça, *Haemaphysalis concinna*, a qual poderia manter a bactéria durante 3 ou 4 anos, através dos múltiplos estádios de vida. Pressupõe-se, ainda, que a infecção de protozoários, como a ameba *Acanthamoeba castellanii*, possa contribuir para uma fase aquática do ciclo de vida de *F. tularensis*, pela produção de cistos e trofozoítos (Abd *et al.*, 2003; El-Etr *et al.*, 2009).

2.2.2.2.Fatores de risco

O risco de infecção com o agente etiológico da Tularémia é consideravelmente variável entre a população. Os grupos de risco são constituídos, principalmente, por caçadores e indivíduos que desempenhem profissões ou atividades relacionadas com a floresta, devido à maior probabilidade de entrar em contato com carcaças ou restos de animais infetados, bem como residentes de áreas rurais onde o contato com animais selvagens ou animais domésticos virtualmente infetados seja relativamente frequente (Gürcan, 2014). Os profissionais de laboratório e médicos veterinários encontram-se igualmente em risco de exposição ao agente, aos quais é aconselhável a utilização de

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

máscara e equipamentos de proteção individual, e o manuseamento num laboratório de biossegurança de nível 3, de forma a evitar a entrada da bactéria pela via conjuntiva (Collins, 1996). Segundo o CDC, para a restante população e para os animais, o risco de contração da doença é aumentado pela exposição a locais, animais, restos de animais ou águas contaminadas com *F. tularensis*, bem como a picada de um vetor infetado ou o consumo de produtos contaminados.

2.2.2.3.Transmissão

A principal forma de transmissão natural do agente é, como referido anteriormente, a vetorial, através dos mosquitos, carraças e outros artrópodes, consoante a localização. A dispersão como aerossol e em fontes de água são outras vias de propagação, bem como o contato com restos ou consumo de animais ou produtos alimentares contaminados (Morner, 1992). Diversas fontes têm evidenciado o papel das lojas de animais de companhia, nas grandes cidades, como potenciais formas de transmissão da doença, especialmente entre animais e humanos, devido à insuficiente regulamentação na proteção dos tratadores e donos, associada à relativa falta de sinais clínicos, ocasionalmente referida na literatura (Halsby *et al.*, 2014). Mais recentemente foi encontrada uma das estirpes de *Francisella* num sistema de ar condicionado (Qu *et al.*, 2013), ampliando as vias possíveis de transmissão deste agente.

2.2.2.4.Prevalência e distribuição mundial

A Tularémia é uma doença característica do hemisfério norte, tendo sido reportada em diversas regiões, incluindo América do Norte, Escandinávia, Balcãs, Anatólia, Médio Oriente, Rússia e Sudeste Asiático (Gürcan, 2014), como mostra a Figura 4.

Para além disto, cada subespécie de *F. tularensis* é endémica de uma dada região. As análises filogenéticas demonstram uma maior prevalência de *F. tularensis tularensis* na América do Norte. Comparativamente, a subespécie *F. tularensis holarctica* predomina na Eurásia e Médio Oriente (Vogler *et al.*, 2009).

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia



Figura 4: Zonas endêmicas de *F. tularensis* (a cinzento), adaptado de Ellis *et al.*, 2002.

Destacando a situação na Península Ibérica, há registo da ocorrência de pelo menos dois surtos em humanos no noroeste de Espanha, o primeiro entre 1997-1998 e o segundo dez anos mais tarde, afetando mais de 1000 pessoas, nas regiões de Zamora, Salamanca, León e Valladolid (Ariza-Miguel *et al.*, 2014). Em Portugal, após o surto de 1998, a Direção Geral de Saúde emitiu um comunicado, em ata médica, acautelando para possíveis surtos de Tularémia (Lopes de Carvalho *et al.*, 2009). Os estudos realizados no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) revelaram uma seroprevalência de 8,9%, anticorpos no sangue, em indivíduos predominantemente assintomáticos residentes no distrito de Bragança, evidenciando um potencial contato indireto com o agente etiológico e uma possível conexão com os surtos nas regiões do país vizinho. Ainda, os resultados destes estudos demonstraram a presença da estirpe *F. tularensis holarctica* em território nacional, isolada de vários ixodídeos vetores, provenientes do mesmo distrito (Lopes de Carvalho *et al.*, 2007).

2.2.3.Patogenia

Durante a bacteriemia, *F. tularensis* apresenta uma fase extracelular e uma fase intracelular, sendo crucial a sobrevivência e multiplicação no ambiente hostil das células que infeta (Forestal *et al.*, 2007), possuindo, para tal, mecanismos patogénicos exclusivos. A cápsula protege-a da ação dos componentes séricos, enquanto o Lipopolisacarídeo (LPS) e uma proteína citoplasmática com 23-kDa promovem a

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

virulência (Osiak *et al.*, 2006). Segundo as mesmas fontes, *F. tularensis* interage com os macrófagos pela via da citocalasina B, a qual afeta o ciclo da actina, inibindo a adição de monómeros de actina no final dos filamentos e reduzindo, conseqüentemente, a taxa de polimerização e a interação entre filamentos (MacLean-Fletcher and Pollard, 1980), inviabilizando, assim um elemento fulcral para a diapedese dos leucócitos, e respetiva função imunitária. A opsonização sérica promove a entrada de *F. tularensis* nas células, encontrando-se associada a diferentes ligandos e moléculas extracelulares, como os recetores CR3, SR-A e Fc γ , nucleolinas e proteína surfactante A pulmonar (Balagopal *et al.*, 2006). Este agente apresenta, igualmente, uma moderada capacidade de limitar a fagocitose, ao expor um reduzido número de ligandos a recetores fagocíticos não oponentes, os quais proporcionam uma maior taxa de sobrevivência dentro do hospedeiro (Geier and Celli, 2011).

Após a entrada na célula, a bactéria desenvolve-se dentro de um fagossoma designado de FCP (fagossoma contendo *Francisella*) (Celli and Zahrt, 2013). Segundo Chong *et al.* (2008), *F. tularensis* impede a fusão com o lisossoma e a acidificação do ambiente, ao recrutar bombas de prótons vacuolares. Isto permite ativar a ilha de patogenicidade de *Francisella*, ou FPI, uma região genómica que codifica um sistema de excreção do tipo VI, relevante para saída do fagossoma, a qual depende do pH intracelular para iniciar.

Para além do referido anteriormente, a sobrevivência de *F. tularensis* relaciona-se com a sua capacidade de evitar a oxidação e as espécies reativas de oxigénio (Celli and Zahrt, 2013). A primeira é conseguida através da inibição parcial da cadeia de ativação da NADPH oxidase, particularmente durante a formação do complexo molecular que dá origem a esta enzima (McCaffrey *et al.*, 2010). Como contra-acção das ROS, esta bactéria recorre, entre outros, à produção de fosfatases ácidas, como a AcpA (Dai *et al.*, 2012), e de superóxido-dismutases (FeSOD, codificado pelo gene *sodB*, e CuZnSOD, codificado pelo gene *sodC*) (Bakshi *et al.*, 2006; Melillo *et al.*, 2009).

O mecanismo de saída do fagossoma permanece relativamente incógnito. À luz dos conhecimentos atuais, envolve, entre outros por revelar, produtos de diversos genes da FPI, estimuladores da biossíntese e da produção de fosfatases ácidas (Celli and Zahrt, 2013). Por fim, a replicação no citosol é executada através da adaptação de diferentes mecanismos relativos à ubiquitinação e sinalização lipídica das células hospedeiras, no sentido de promover a replicação (Akimana *et al.*, 2010).

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

2.2.4.Quadro clínico e lesional

A forma de manifestação desta doença varia conforme a subespécie ou a via de entrada (Ulu-Kilic and Doganay, 2014), estimando-se que o período de incubação do agente etiológico varie entre 2 a 14 dias (Dennis *et al.*, 2001). Segundo, Santiago *et al.* (2015), a espécie *F. tularensis tularensis* apresenta maior virulência, com um dose infecciosa (ID₅₀) menor que 10 unidades formadoras de colônias (cfu), provocando sinais clínicos ou sintomas mais severos, atingindo taxas de mortalidade até 60%, quando não tratada. Os mesmos autores referem que a subespécie *F. tularensis holarctica* provoca sinais clínicos ou sintomas mais moderados e apresenta uma ID₅₀ maior (10³ cfu).

Num panorama de uso bioterrorista, a forma esperada seria a pneumónica, cujos sintomas incluem febre, tosse e dispneia, ocasionalmente evoluindo para paragem respiratória e choque séptico (Adalja *et al.*, 2015), podendo ser acompanhados de dor de cabeça severa, mialgias e efusões pleurais parcialmente hemorrágicas (Cunha, 2002). Fora deste panorama, a Tularémia ulceroglandular ocorre com maior frequência, segundo o CDC. Esta resulta da transmissão por picada, afetando a pele e induzindo a formação de tumefações nodulares linfáticas e úlceras (Lubbert *et al.*, 2009). Entre as manifestações menos regulares desta doença encontram-se a glandular, orofaríngeal, oculoglandular e tifóide (Sobolewska-Pilarczyk *et al.*, 2014). De acordo com o CDC, os sintomas assemelham-se à forma ulceroglandular, incluindo febre, linfadenopatia e inflamação ou irritação do órgão afetado.

2.2.5.Diagnóstico

Segundo o CDC, a cultura permanece o método de diagnóstico de referência para confirmação da infeção por esta bactéria. No entanto, *F. tularensis tularensis* e *F. tularensis holarctica* apresentam um crescimento lento, metabolicamente exigente, e que necessitam de 24-72 horas, a 37°C, num laboratório de nível de biossegurança 3 (Barroso *et al.*, 2014). As mesmas fontes referem que os meios mais propícios para o crescimento são o agar chocolate, agar de extrato de fermento de carvão tamponado e agar de cisteína enriquecido com sangue chocolate, optando-se preferencialmente por este último, devido às características colônias brilhantes.

Alternativamente, podem ser usados métodos serológicos para diagnosticar este agente. Segundo Schmitt *et al.* (2005), a combinação de ensaio ELISA com o ensaio de Western Blot, baseados num polissacarídeo e no antigénio total, respetivamente, revelou-se preciso e sensível na confirmação laboratorial da doença e em estudos

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

epidemiológicos de larga escala. Outro teste serológico referido como vantajoso é a microaglutinação, o qual se revelou extremamente sensível e específico, salientando a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas com diferentes espécies, como *Brucella* e *Yersinia* (Porsch-Ozcurumez *et al.*, 2004).

Diagnósticos baseados na biologia molecular têm ganho maior popularidade na identificação de *F. tularensis*, em consequência da obtenção de resultados fiáveis em menor tempo. Um dos métodos moleculares mais utilizados é a PCR, usando “primers” para o gene TUL4, como identificador do género, e para uma região génica mais específica da subespécie, como a RD1 no caso de *F. tularensis holarctica* (Karagoz *et al.*, 2013). Outro método de diagnóstico molecular referido é a espectrometria de massa por MALDI-TOF (Afanas'ev *et al.*, 2015), a qual se tem revelado promissora devido aos baixos custos materiais e humanos e às várias opções de identificação, a partir de uma estirpe de referência. A obrigatoriedade de existir uma estirpe de referência para validação de resultados é uma virtual limitação deste método, que depende dos perfis guardados nas bases de dados, e, conseqüentemente, da necessidade de cultura do microrganismo (Singhal *et al.*, 2015).

2.2.6.Prevenção e tratamento

A prevenção desta doença requer o cumprimento de diversos pressupostos. Salientam-se, entre estes, o uso de vestuário apropriado e de repelentes de insetos, e evitar consumir água contaminada ou comida mal confeccionada, em países endémicos (Ulu-Kilic and Doganay, 2014). Nas profissões com maior risco de exposição, como caçadores, médicos veterinários, técnicos de emergências e técnicos de laboratório, aconselha-se maior atenção aos sintomas e sinais, tanto do indivíduo como do animal em causa, bem como é obrigatório um nível maior de biossegurança (nível 3) no manuseamento da bactéria, em resultado da sua elevada infeciosidade (Adalja *et al.*, 2015; Cunha, 2002).

A vacina atenuada para *F. tularensis* continua sob revisão pela “U.S. Food and Drug Administration” (FDA). Assim, no tratamento de *F. tularensis* são normalmente usados antibióticos, como a estreptomicina e a gentamicina (Dennis *et al.*, 2001), durante 10 dias, ou durante 7 dias para profilaxia pós exposição (Adalja *et al.*, 2015). Para além destes, encontra-se recomendado o uso de cloranfenicol, macrólidos e fármacos associados a aminoglicosídeos (O'Brien *et al.*, 2003).

2.Zoonoses emergentes: a Nocardiose e a Tularémia

Mais recentemente, tem sido proposta uma nanopartícula regulada pelo pH, a qual liberta moxifloxacina, revelando-se mais específica e eficaz no tratamento da Tularémia pneumónica (Li *et al.*, 2015).

2.2.7.Potencial zoonótico

O estudo dos surtos epidémicos de Tularémia em Espanha revelou que ambos coincidiram com picos populacionais do rato silvestre (*Microtus arvalis*), colocando a hipótese de poder haver uma correlação entre as duas (Luque-Larena *et al.*, 2015). As análises moleculares aos isolados de *Francisella* das regiões afetadas pelo surto, demonstrou que as estirpes envolvidas eram endémicas da região (Ariza-Miguel *et al.*, 2014), reforçando a hipótese anterior e salientando o potencial zoonótico desta bactéria, ao persistir nos reservatórios.

Fora da Península Ibérica, têm-se registado casos em países não endémicos, como a Holanda, onde se acredita que a reemergência do agente da Tularémia e dos vetores associados nos países vizinhos seja responsável pela entrada no país (Maraha *et al.*, 2013). Na Alemanha, vizinha da Holanda, encontram-se descritos vários casos de caçadores de lebres que desenvolveram a sintomatologia associada após a caçada. A genotipagem dos isolados dos envolvidos identificou um *cluster* com polimorfismos exclusivos, até à data da publicação, da transmissão entre estes (Otto *et al.*, 2015).

Por fim, uma publicação no “Center for Food Security and Public Health” (CFSPH), de Spickler (2009), evidencia distintas formas de transmissão e manutenção do agente da Tularémia entre animais selvagens e domésticos/ de companhia, referindo vários exemplos da transmissão em cães, através do canibalismo, de artrópodes e de vetores, bem como da transmissão entre humanos e animais de companhia saudáveis, em resultado de mordedura, arranhões ou saliva, com especial suspeitas de contato com animais selvagens infetados. Esta publicação destaca ainda uma correlação positiva entre surtos do agente em ovinos e picos deste nos reservatórios naturais, em anos anteriores.

3.Objetivos

Como muitas zoonoses, um surto de *Francisella* spp. ou a contaminação com *Nocardia* spp. acarretam consequências graves, sejam económicas, se considerarmos a infeção de animais domésticos e de produção, ou de saúde pública, quando afeta seres humanos ou animais de companhia.

Este trabalho visou melhorar o conhecimento relativamente à presença e distribuição destas bactérias numa determinada área do território nacional com interações homem-animal-ambiente relativamente frequentes. Neste estudo recorreu-se, para o efeito, a técnicas moleculares de diagnóstico, e a espécies socioeconomicamente importantes, nomeadamente javalis e veados, e outros animais selvagens encontrados no mesmo habitat. Para o propósito procedeu-se a:

- Extração de DNA das várias amostras, através de kits comerciais;
- Detecção de *Nocardia* spp. através da Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase;
- Detecção de *Francisella* spp. através da Técnica de Reacção em Cadeia de Polimerase;
- Estudo da prevalência destes agentes zoonóticos em diferentes espécies de animais selvagens.

4. Material e métodos

4.1. Amostras

As amostras de órgãos utilizadas neste estudo foram obtidas durante várias épocas de caça (2009 a 2014), em datas consecutivas, dentro de diferentes locais do distrito de Castelo Branco. No total estudaram-se 114 animais selvagens: 37 veados, 36 javalis, 19 raposas, 12 saca-rabos, 1 texugo, 2 lontras, 3 fuinhas, 2 ouriços, 1 coelho e 1 gineto. A lista dos animais utilizados para recolha de amostras encontra-se na Tabela 1.

Para o estudo, foram utilizados mais de 200 tecidos, provenientes dos diferentes animais selvagens acima mencionados, os quais incluíam diferentes gânglios linfáticos, válvula ileocecal, amígdalas, pulmão, fígado, bexiga, rim, cérebro, intestino e algumas “pools”, ou misturas, de tecidos.

Neste estudo foi efetuada uma minuciosa inspeção *post-mortem* por um médico veterinário, durante a necrópsia. As amostras de tecidos foram recolhidas e armazenadas a 4°C e a -20°C, em recipientes apropriados e esterilizados, até cerca de seis horas após a colheita.

Tabela 1: Lista dos animais utilizados para recolha das amostras.

Animal	Época de caça				
	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/13
Veado	16	16	5	0	0
Javali	4	24	8	0	0
Raposa	1	5	5	7	1
Saca-rabos	1	2	3	5	1
Texugo	0	1	0	0	0
Lontra	0	2	0	0	0
Fuíinha	0	1	1	1	0
Ouriço	0	1	0	1	0
Coelho	0	0	1	0	0
Gineto	0	0	1	0	0

4.2. Extração de DNA a partir de tecidos

Para a extração de DNA a partir dos tecidos procedeu-se de acordo com o descrito em seguida.

Todas as amostras foram processadas, a nível laboratorial, numa câmara de fluxo laminar de nível de biossegurança 2. Cada amostra foi armazenada a -20°C. Posteriormente, a cada uma retirou-se aproximadamente 20 mg de tecido, o qual foi macerado com azoto líquido num almofariz. De seguida, o macerado resultante foi colocado num tubo de 2 mL, e conservado a -20°C até à realização da extração de DNA.

4. Material e Métodos

A extração de DNA foi realizada a partir de alguns tecidos, com recurso ao “kit” comercial “DNeasy Blood and Tissue Kit” (Qiagen®, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Segundo a informação deste “kit”, os ácidos nucleicos celulares ligam-se seletivamente à membrana de sílica da coluna de extração, e o DNA liga-se à coluna. Posteriormente estes são lavados com um tampão adequado, de forma a eliminar possíveis contaminantes celulares. Por fim, a diluição com baixa concentração salina possibilita a libertação do DNA da membrana.

Neste estudo homogeneizou-se aproximadamente 25 mg de tecido num tubo de 1,5 mL, sendo incubado a 56°C com 20 µL de proteínase K e 180 µL de tampão de lise (Buffer ATL), até se obter a lise completa dos tecidos.

Seguidamente, foram adicionados 200 µL de tampão de ligação (Buffer AL) e agitou-se vigorosamente, recorrendo ao vórtex, 200 µL de etanol, a 96%, foram adicionados e a mistura foi homogeneizada. Combinou-se a coluna de extração com o tubo de recolha, pipetou-se o total da mistura para a coluna e centrifugou-se durante 1 minuto a 6000 g, à temperatura ambiente.

Desprezando o líquido recolhido, combinou-se a coluna com o novo tubo de recolha. Adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem (Buffer AW1) e centrifugou-se durante 1 minuto a 6000 g, à temperatura ambiente. Desprezando novamente o líquido recolhido, voltou-se a combinar a coluna com um novo tubo de recolha. Realizou-se, então, uma lavagem, durante 1 minuto a 20000 g, com 500 µL de tampão de lavagem (Buffer AW2).

Por último, o DNA extraído foi eluído com 200 µL de tampão de eluição (Buffer AE) e centrifugado durante 1 minuto a 6000 g. Depois de extraído, o DNA foi conservado a -20°C até à sua utilização.

4.3. Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase e deteção

Para a amplificação e deteção dos microrganismos em estudo aplicou-se a metodologia abordada nos pontos seguintes.

4.3.1. *Nocardia* spp.

Para a deteção de *Nocardia* spp., foi efetuada uma mistura de reação com 20 µL, cuja descrição dos componentes utilizados se encontra na Tabela 2. Além disto, a sequência específica de cada primer usado encontra-se na Tabela 3.

Tabela 2: Descrição da mistura de reação de PCR.

Componente	Quantidade
DNA	3 µL
Primer NG1 (10 µM)	1 µL
Primer NG2 (10 µM)	1 µL
Taq Master Mix Bioron® (2x)	10 µL
H ₂ O	5 µL
Total	20 µL

Tabela 3: Descrição da sequência dos “primers”.

Designação do “primer”	Sequência (5’ – 3’)
NG1	ACCGACCACAAGGGG
NG2	GGTTGTAACCTCTTCGA

Os “primers” utilizados são específicos do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, que apesar de ser bastante conservada em actinomicetes, contém dois nucleótidos específicos para o género *Nocardia*, os quais foram utilizados para desenhar os “primers”. Estes amplificam um fragmento com 596 pb, observado em todas as estirpes desta bactéria (Laurent *et al.*, 1999).

A mistura foi posteriormente levada ao termociclador (T100™ Thermal Cycler, da Bio-Rad). Inicialmente, as condições de reação foram as descritas por Laurent *et al.*, 1999, com posterior otimização. As condições utilizadas encontram-se descritas na Tabela 4. Como validação e controlo da PCR ocorrida, em cada ensaio utilizou-se um controlo positivo (amostra com a bactéria presente) e um controlo negativo (água).

Tabela 4: Descrição das condições de ciclos e temperaturas de reação da PCR.

Nº ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	10 min
34	94°C	1 min
34	55°C	20 segs
34	72°C	1 min
1	72°C	10 min
---	4°C	∞

4.3.2. *Francisella* spp.

Para a detecção de *Francisella* spp., foi utilizada uma mistura de reação com 20 µL, apresentada em maior detalhe na Tabela 5, cuja sequência dos “primers” utilizados se encontra descrita na Tabela 6.

Tabela 5: Descrição da mistura de reação de PCR.

Componentes	Volume
DNA	3 µL
Tampão (10x)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µL
dNTPs (2,5 mM)	2,0 µL
<i>Taq</i> DNA Polimerase (recombinant) Thermo Scientific® (EP0402) (2x)	0,5 µL
“Primer” <i>tul4</i> – 435 (10 µM)	0,5 µL
“Primer” <i>tul4</i> – 863 (10 µM)	0,5 µL
H ₂ O	8,5 µL
Total	20 µL

Tabela 6: Descrição da sequência dos “primers”.

Nome do “Primer”	Sequência (5’ – 3’)
<i>tul4</i> – 435	GCTGTATCATCATTTAATAAACTGCTG
<i>tul4</i> – 863	TTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT

Os “primers” descritos na Tabela 6, amplificam um fragmento com 410 bps, correspondentes a uma região do gene *tul4* que codifica uma proteína membrana com cerca de 17 kDa (Wang *et al.*, 2011). Este gene é uma escolha frequente para o diagnóstico de *F. tularensis*, tendo sido adaptado para PCR convencional e para PCR em Tempo Real (Sellek *et al.*, 2008; Kormilitsyna *et al.*, 2013).

A mistura referida na Tabela 5 foi colocada no termociclador (Veriti, da Applied Biosystems). As condições de reação foram as inicialmente descritas por Wang *et al.* (2011), sendo posteriormente otimizadas. As condições utilizadas encontram-se descritas na Tabela 7. Como validação e controlo da PCR, em cada ensaio utilizou-se um controlo negativo (água).

Tabela 7: Descrição dos parâmetros de reacção da PCR.

Nº ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	10 min
34	94°C	30 s
34	60°C	1:30 min
34	75°C	1 min
1	75°C	10 min
---	4°C	∞

4.4. Electroforese em gel de agarose

Após a PCR, realizou-se a eletroforese em gel de agarose de forma a analisar os produtos de amplificação obtidos (ou a sua ausência). Para tal, pesou-se agarose em pó e misturou-se num dado volume de tampão TBE 1x (Tris – Borato- EDTA). As quantidades pesadas e o volume de tampão dependiam do tamanho do gel e da concentração desejada. A mistura foi então aquecida, até que a agarose estivesse completamente dissolvida, e se encontrasse homogénea. Após este passo, adicionou-se 1,5 µL Green Safe® Nzytech (em alternativa ao brometo de etídio), em 80 ml de gel de agarose. De seguida, homogeneizou-se e deixou-se arrefecer ligeiramente à temperatura ambiente. Após, e antes de solidificar, a mistura foi transferida para um recipiente plastificado com um pente, para formar os poços para deposição das amostras. A cada microtubo com o produto amplificado foram misturados 3 µL de solução de deposição (6x “Loading Dye Solution, da Thermo Scientific® (R0611)”), com o objetivo de aumentar a densidade do DNA, e permitir a sua deposição nos poços.

As amostras foram, posteriormente, depositadas no gel de agarose imerso em TBE 1X (diluído de TBE 10X “Ultra Pure Buffer Concentrate, NationalDiagnostics”), na tina de electroforese. Foram ainda pipetados 2 µL de marcador de peso molecular (com a especificação “Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific®”) e colocados nos poços das extremidades. A tina foi ligada a uma fonte de alimentação a 90 V e 95 A, durante aproximadamente 45 minutos.

4.5. Visualização do gel e análise dos dados

A visualização do gel depois da captura de imagem no equipamento Molecular Imager Gel Doc™ XR, associado ao software Image Lab™, ambos da Bio-Rad. Para a análise e tratamento estatístico dos dados foi utilizado o programa SPSS® 22.0.

5.Resultados

5.1.*Nocardia spp.*

A técnica de PCR utilizada revelou-se capaz de detetar este organismo. Como pode ser observado na Figura 5, o tamanho das bandas, representantes do produto de amplificação com os “*primers*” utilizados, encontra-se em concordância com o tamanho mencionado no artigo de referência, bem como com trabalhos anteriores e com a análise bioinformática do fragmento (Alfaresi and Elkosh, 2006).

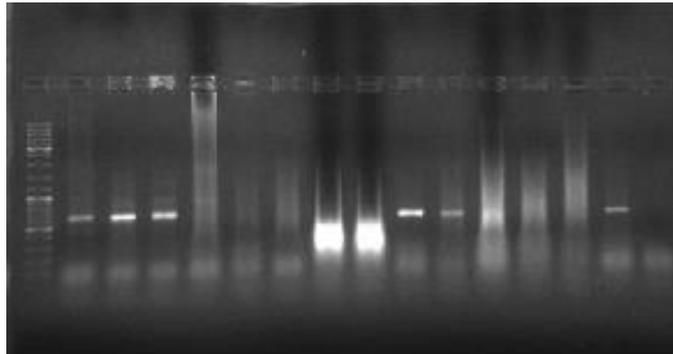


Figura 5: Gel de agarose após amplificação por PCR, para detecção de *Nocardia spp.*, demonstrando a banda de 596 bps.

Dos animais selvagens estudados, *Nocardia spp.* foi detetada, por PCR, em 63 deles, apresentando, uma prevalência de 55,3% (IC 95%: 46,2% - 64,4%), e abrangendo nove das dez espécies estudadas: 12/19 (63,2%; IC 95%: 41,5 - 84,9%) Raposas Vermelhas (*Vulpes vulpes*), 3/3 (100%) Fuinhas (*Martes foina*), 2/2 (100%) Lontras Euro-Asiáticas (*Lutra lutra*), 1/1 (100%) Texugo Europeu (*Meles meles*), 1/1 (100%) Gineto (*Genetta genetta*), 10/12 (83,3%; IC 95%: 62,2 - 100%), Saca-rabos (*Herpestes ichneumon*), 1/2 (50%) Ouriço (*Erinaceus europaeus*), 16/36 (44,4%; IC 95%: 28,2 - 60,6%) Javalis (*Sus scrofa*), 17/37 (45,9%; 29,8 - 62,0%) Veados Vermelhos (*Cervus elaphus*). Estas espécies distribuem-se por sete famílias taxonómicas diferentes: Canidae (63,2% positivas), Mustelidae (100% positivas), Viverridae (100% positivas), Herpestidae (83,3% positivas), Erinaceidae (50,0% positivas), Suidae (44,4% positivas), e Cervidae (55,3% positivas). Porém, a análise foi negativa num Coelho Selvagem (*Oryctolagus cuniculus*). Esta informação encontra-se descrita na Tabela 8.

Tabela 8: Distribuição de *Nocardia* spp. por famílias taxonómicas e espécies em animais selvagens recolhidos e examinados entre 2009 e 2013.

Espécie		Total recolhas <i>n</i>	Total de positivos <i>n</i>	Prevalência na espécie %	95% CI
Canidae (<i>n</i> =19)	Raposa Vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	19	12	63,2	41,5 - 84,9
Mustelidae (<i>n</i> =6)	Fuinha (<i>Martes foina</i>)	3	3	—	—
	Lontra euro-asiática (<i>Lutra lutra</i>)	2	2	—	—
	Texugo Europeu (<i>Meles meles</i>)	1	1	—	—
Viverridae (<i>n</i> =1)	Gineto comum (<i>Genetta genetta</i>)	1	1	—	—
Herpestidae (<i>n</i> =12)	Saca-rabos (<i>Herpestes ichneumon</i>)	12	10	83,3	62,2 - 100
Erinaceidae (<i>n</i> =2)	Ouriço (<i>Erinaceus europaeus</i>)	2	1	—	—
Leporidae (<i>n</i> =1)	Coelho selvagem (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	1	0	—	—
Suidae (<i>n</i> =36)	Javali (<i>Sus scrofa</i>)	36	16	44,4	28,2 - 60,6
Cervidae (<i>n</i> =37)	Veado Vermelho (<i>Cervus elaphus</i>)	37	17	45,9	29,8 - 62,0
Total		114	63	55,3	46,2 - 64,4

Das 206 amostras de tecidos estudadas pela técnica de PCR, *Nocardia* spp. foi detetada em 83 (40,3%; 95% CI: 33,6 – 47%), com predominância em gânglios linfáticos mesentéricos (13,1%) e em rins (9,2%). Além destes, foi possível, ocasionalmente, detetar esta bactéria noutros tecidos, como pulmões (5,3%), bexiga (2,4%), gânglios linfáticos mediastinais (2,4%), amígdalas (1,9%), gânglios linfáticos retrofaríngeos (0,97%), válvulas ileocecais (0,97%), cérebro (0,49%), fígado (0,49%) e em 6 *pools* (2,9%) de tecidos com 3 tecidos cada. As diferenças na deteção foram consideradas como estatisticamente significativas ($p=0,019$). Estes dados encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Distribuição dos resultados positivos na PCR em 206 amostras de tecidos de 114 mamíferos selvagens.

Tecido examinado	PCR positivas n (%)
Gânglios Linfáticos Mesentéricos	27 (13,1%)
Gânglios Linfáticos Mediastinais	5 (2,4%)
Gânglios Linfáticos Retrofaríngeos	2 (0,97%)
Bexiga	5 (2,4%)
Rins	19 (9,2%)
Amígdalas	4 (1,9%)
Pulmões	11 (5,3%)
Válvulas Ileocecais	2 (0,97%)
Cérebro	1 (0,49%)
Fígado	1 (0,49%)
Pool de Tecidos	6 (2,9%)
Total de Tecidos positivos	83 (40,3%)

A análise anátomo-patológica dos tecidos permitiu detetar lesões em 65 animais (57,0%). Dos 114 animais analisados, as lesões consistiam em abscessos (1/114; 0,9%), granulomas caseo - calcários (21/114; 18,4%), dermatite (1/114; 0,9%), hipertrofia dos gânglios linfáticos (2/114; 1,8%), linfadenite purulenta (39/114; 34,2%) e orquites (1/114; 0,9%). Destes tecidos, a PCR foi positiva em 1 animal com abscessos, 7 com granulomas com calcificação caseosa, 1 animal com dermatite, 1 com hipertrofia dos gânglios linfáticos e em 16 com linfadenite purulenta. Estes resultados podem ser observados na Tabela 10.

Neste estudo, 10,5% dos animais não aparentavam ter lesões visíveis e deram resultado negativo na reação de PCR. Em contraste, em 32,5% teoricamente saudáveis, o resultado da reação PCR foi positivo. Além disso, nos animais com lesões, a reação de PCR foi negativa em 34,2%, e positiva em 22,8%, como demonstrado na Tabela 11.

A ocorrência de *Nocardia* spp. foi mais frequente em machos adultos (26,3%) e menos frequente em fêmeas juvenis (6,1%), como se pode observar na Tabela 12.

Tabela 10: Distribuição dos resultados positivos da PCR em amostras com lesões observadas nos 114 mamíferos selvagens.

Lesões observadas	PCR positivos <i>n</i> (%)	PCR negativos <i>n</i> (%)	Total de animais com lesões <i>n</i>
Abcessos	1	0	1
Granulomas caseo – calcários	7 (33,3%)	14 (66,7%)	21
Dermatite	1	0	1
Hipertrofia dos gânglios linfáticos	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2
Linfadenite purulenta	16 (41,0%)	23 (59,0%)	39
Orquites	0	1	1
Sem lesões	37 (75,5%)	12 (24,5%)	49

Tabela 11: Frequência de animais nas diferentes categorias de resultados testados.

Espécie	S/ lesões PCR -	S/ lesões PCR +	C/ lesões PCR -	C/ lesões PCR +
Raposa Vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	7	11	0	1
Fuinha (<i>Martes foina</i>)	0	3	0	0
Gineto comum (<i>Genetta genetta</i>)	0	1	0	0
Lontra (<i>Lutra lutra</i>)	0	2	0	0
Saca-rabos (<i>Herpestes ichneumon</i>)	2	10	0	0
Texugo Europeu (<i>Meles meles</i>)	0	1	0	0
Ouriço (<i>Erinaceus europaeus</i>)	1	1	0	0
Coelho selvagem (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	1	0	0	0
Javali (<i>Sus scrofa</i>)	1	6	19	10
Veado Vermelho (<i>Cervus elaphus</i>)	0	2	20	15
Total <i>n</i> (%)	12 (10,5%)	37 (32,5%)	39 (34,2%)	26 (22,8%)

Tabela 12: Frequência e ocorrência de *Nocardia* spp., em casos confirmados, por idade e sexo.

Espécies	Machos		Fêmeas	
	Juvenis <i>n</i>	Adultos <i>n</i>	Juvenis <i>n</i>	Adultos <i>n</i>
Raposa Vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	4	6	1	1
Fuinha (<i>Martes foina</i>)	1	1	1	0
Gineto comum (<i>Genetta genetta</i>)	0	0	0	1
Lontra (<i>Lutra lutra</i>)	0	1	0	1
Saca-rabos (<i>Herpestes ichneumon</i>)	1	4	2	3
Texugo Europeu (<i>Meles meles</i>)	0	0	0	0
Ouriço (<i>Erinaceus europaeus</i>)	0	1	0	0
Javali (<i>Sus scrofa</i>)	5	5	3	3
Veado Vermelho (<i>Cervus elaphus</i>)	2	11	0	4
Total <i>n</i> (%)	13 (11,4%)	30 (26,3%)	7 (6,1%)	13 (11,4%)

Por fim, relacionaram-se os casos positivos de infecção por *Nocardia* spp. com a localização geográfica onde ocorreram. Esta associação demonstrou que a maioria dos casos ocorreu no concelho de Idanha-a-Nova (47; 72,3%), Penamacor (17; 26,2%) e Castelo Branco (1; 1,54%). Isto pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13: Localização geográfica (por concelho) dos casos comprovados de infecção por *Nocardia* spp.

Local de caça	Número de casos de <i>Nocardia</i> spp., <i>n</i> (%)
Idanha-a-Nova	47 (72,3%)
Penamacor	17 (26,2%)
Castelo Branco	1 (1,54%)
Total	65

5.2. *Francisella* spp.

Os “primers” utilizados eram específicos para uma lipoproteína membranar de *Francisella* spp., não apresentando quaisquer outras correspondências quando analisado por ferramentas bioinformáticas. Assim, dado que a banda obtida por PCR apresentou menor tamanho do que o esperado, com aproximadamente 300 pb, consideram-se todos os resultados em que se observou amplificação como potenciais positivos. A Figura 6 exemplifica um dos resultados obtidos nos géis de agarose.

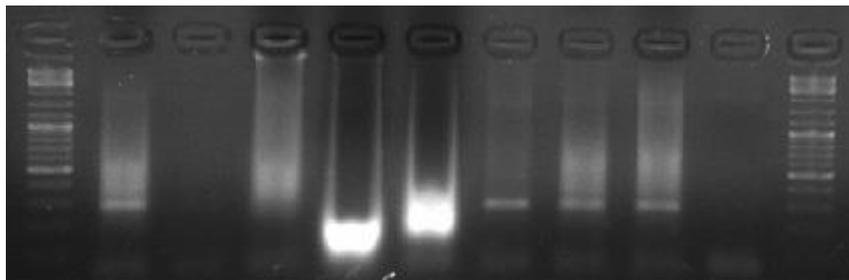


Figura 6: Gel de agarose após amplificação por PCR, para detecção de *Francisella* spp., expondo a banda de 300 pb, aproximadamente.

Com vista à conservação do remanescente em várias amostras, para estudos futuros similares, o número de tecidos e, conseqüentemente, animais, analisados foi menor, comparativamente ao estudo de *Nocardia* spp.

Posto isto, foram analisados 79 animais selvagens: 18 Raposas Vermelhas (*Vulpes vulpes*), 3 Fuínhas (*Martes foina*), 2 Lontras euro-asiáticas (*Lutra lutra*), 1 Texugo Europeu (*Meles meles*), 10 Saca-rabos (*Herpestes ichneumon*), 2 Ouriços (*Erinaceus europaeus*), 1 Coelho selvagem (*Oryctolagus cuniculus*), 19 Javalis selvagens (*Sus scrofa*) e 23 Veados Vermelhos (*Cervus elaphus*). Deste total, 20 animais selvagens revelaram a presença da potencial bactéria, indicando uma prevalência de 25,3% (IC 95%: 15,7-34,9%). Adicionalmente, quatro das dez espécies estudadas foram afetadas, nomeadamente: 2/18 (11,1%) Raposas Vermelhas (*Vulpes vulpes*), 4/10 (40,0%) Saca-rabos (*Herpestes ichneumon*), 12/19 (63,2%) Javalis (*Sus scrofa*) e 2/23 (8,7%) Veados Vermelhos (*Cervus elaphus*). Estas espécies englobam-se em famílias taxonómicas distintas: Canidae (11,1% positivas), Herpestidae (30,0% positivas), Suidae (63,2% positivas) e Cervidae (8,7% positivas). Em contraste, não se verificou qualquer deteção nas amostras de Texugo Europeu (*Meles meles*), Ouriço (*Erinaceus europaeus*), Fuínhas (*Martes foina*), Lontras Euro-Asiáticas (*Lutra lutra*) e Coelho Selvagem (*Oryctolagus cuniculus*). Estes resultados encontram-se descritos com mais detalhe na Tabela 14.

A análise a 130 amostras de diversos tecidos, provenientes dos 79 animais selvagens recolhidos, pela técnica de PCR, revelou a presença desta potencial bactéria em 18 tecidos (13,8%; IC 95%: 7,9-19,7%). Os órgãos com maior ocorrência foram gânglios linfáticos mesentéricos (9, 32,1%), rins (3, 9,1%) e pulmões (3, 15,0%). Esta bactéria foi igualmente detetada, com menor frequência, noutros órgãos, como descrito na Tabela 15.

Tabela 14: Potenciais casos de *Francisella* spp. detetados, por famílias taxonómicas e espécies em animais selvagens recolhidos e examinados entre 2009 e 2013.

Espécie		Total recolhas <i>n</i>	Total de positivos <i>n</i>	Prevalência na espécie %
Canidae (n=18)	Raposa Vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	18	2	11,1
Mustelidae (n=6)	Fuinha (<i>Martes foina</i>)	3	0	—
	Lontra euro-asiática (<i>Lutra lutra</i>)	2	0	—
	Texugo Europeu (<i>Meles meles</i>)	1	0	—
Herpestidae (n=10)	Saca-rabos (<i>Herpestes ichneumon</i>)	10	4	40,0
Erinaceidae (n=2)	Ouriço (<i>Erinaceus europaeus</i>)	2	0	—
Leporidae (n=1)	Coelho selvagem (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	1	0	—
Suidae (n=19)	Javali selvagem (<i>Sus scrofa</i>)	19	12	63,2
Cervidae (n=23)	Veado Vermelho (<i>Cervus elaphus</i>)	23	2	8,7
Total		79	20	25,3

Tabela 15: Distribuição dos resultados positivos na PCR em 130 amostras de tecidos de 79 mamíferos selvagens.

Tecido examinado	PCR positivas <i>n</i> (%)
Gânglios Linfáticos Mesentéricos	9 (32,1%)
Gânglios Linfáticos Mediastinais	1 (7,7%)
Gânglios Linfáticos Retrofaríngeos	1 (14,3%)
Rins	3 (9,1%)
Pulmões	3 (15,0%)
Fígado	1 (20,0%)
Total de Tecidos positivos	18 (13,8%)

Os exames de anatomia patológica revelaram lesões em 34 das 79 espécies selvagens em estudo, com destaque para linfadenite purulenta (34,2%) e granulomas caseo - calcários (6,3%). A análise por PCR aos tecidos dos animais referidos revelou 5 positivos com linfadenite purulenta (18,5%), 2 positivos com granulomas caseo-calcários (40,0%) e 1 positivo com hipertrofia dos gânglios linfáticos. Quanto aos animais que não apresentavam quaisquer lesões relevantes no exame *post mortem*, a

5. Resultados

análise por PCR amplificou o potencial agente em 12 das 45 amostras. Estes resultados encontram-se descritos em maior detalhe na Tabela 16.

Tabela 16: Distribuição dos resultados da PCR em amostras com lesões observadas nos 79 animais selvagens.

Lesões observadas	PCR positivos <i>n</i> (%)	PCR negativos <i>n</i> (%)	Total de animais envolvidos <i>n</i>
Granulomas caseo – calcários	2 (40,0%)	3 60,0%)	5
Dermatite	0	1	1
Hipertrofia dos gânglios linfáticos	1	0	1
Linfadenite purulenta	5 (18,5%)	22 (81,5%)	27
Sem lesões	12 (26,7%)	33 (73,3%)	45

A presença do potencial microrganismo ocorreu maioritariamente em machos juvenis (35%) e adultos (30%). Por outro lado, as fêmeas apresentaram um menor número de casos, especialmente as juvenis (15%), como exposto na Tabela 17. Além disso, a distribuição dos casos atribuiu uma maior presença deste agente em animais provenientes de Idanha-a-Nova (55%) e de Penamacor (45%), como se pode observar na Tabela 18.

Tabela 17: Frequência e ocorrência de casos potenciais de *Francisella* spp., por idade e sexo.

Espécies	Machos		Fêmeas	
	Juvenis <i>n</i>	Adultos <i>n</i>	Juvenis <i>n</i>	Adultos <i>n</i>
Raposa Vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	2	0	0	0
Saca-rabos (<i>Herpestes ichneumon</i>)	0	3	0	1
Javali Selvagem (<i>Sus scrofa</i>)	4	3	3	2
Veado Vermelho (<i>Cervus elaphus</i>)	1	0	0	1
Total <i>n</i> (%)	7 (35%)	6 (30%)	3 (15%)	4 (20%)

Tabela 18: Localização geográfica (por concelho) dos casos potenciais de *Francisella* spp.

Local de caça	Número de casos potenciais de <i>Francisella</i> spp., <i>n</i> (%)
Idanha-a-Nova	11 (55%)
Penamacor	9 (45%)
Total	20

6.Discussão

A aproximação entre o domínio rural e o domínio selvagem, torna mais frequente o contato entre animais selvagens e domésticos, facilitando assim a exposição dos mesmos a diferentes agentes patogênicos, e a transmissão de várias doenças infecciosas, incluindo zoonoses. Estas, podendo ser transmitidas ao Homem, apresentam um risco para saúde pública das comunidades mais próximas (Gadaga *et al.*, 2015). As interações referidas têm-se demonstrado fulcrais na emergência ou re-emergência de muitas zoonoses, estimulando um interesse crescente no estudo desta classe de doenças (Miller and Olea-Popelka, 2013).

6.1.*Nocardia* spp.

O número de casos de *Nocardia* spp. reportados, bem como a sua gama de hospedeiros, tem aumentado (Kogure *et al.*, 2010), possivelmente em resultado de uma maior atenção por parte da comunidade científica a esta bactéria, bem como a uma melhoria nas técnicas de diagnóstico. No caso do estudo realizado, a presença de *Nocardia* spp. englobou diferentes animais. Estudos prévios revelaram a presença desta bactéria em javalis (*Sus scrofa*) e veados (*Cervus elaphus*). No entanto, não existia registo de infeções por *Nocardia* spp. em Raposas (*Vulpes vulpes*), Fuínhas (*Martes foina*), Ginetos (*Genetta genetta*), Lontras (*Lutra lutra*), Ouriços (*Erinaceus europaeus*), Saca-rabos (*Herpestes ichneumon*) e Texugos (*Meles meles*), em território nacional. Para além de evidenciarem o leque de hospedeiros desta bactéria, sugerem, paralelamente, uma relação complexa na sua transmissão inter-espécies. O fato de se ter verificado prevalências elevadas em espécies como Saca-rabos, Raposas, Ginetos, Lontras, Fuínhas e Texugos, aponta para uma possível associação entre a transmissão e a hierarquia trófica dentro do território analisado. Esta hipótese é apresentada em resultado do lugar que estas espécies ocupam na cadeia alimentar, por serem carnívoros, sugerindo uma potencial infeção por ingestão de animais infetados ou contato com cadáveres infetados.

Esta hipótese é reforçada pela análise dos órgãos afetados. Os órgãos mais afetados foram os gânglios linfáticos, com especial referência para os gânglios linfáticos mesentéricos. Estes estão envolvidos na resposta imunitária e inserem-se nos tecidos linfóides associados ao intestino (Ramiro-Puig *et al.*, 2008). No entanto, verificou-se, identicamente, uma percentagem significativa de infeção em órgãos como rins, pulmões e bexiga. Devido às formas de transmissão reportadas, e os diferentes meios onde esta

bactéria já foi encontrada, estes resultados remetem para uma possível transmissão por via aérea, com colonização (no caso dos pulmões). Nesta parte ressalta-se a presença da bactéria num cérebro, a qual é concordante com um caso de infeção generalizada (Saubolle and Sussland, 2003). Por fim, a análise das lesões verificadas em animais infetados levantou outra possível razão para as poucas suspeitas de infeção por *Nocardia* spp.: a maioria dos animais infetados, em estudo, não apresentava nenhuma lesão *post mortem* de relevância. E mesmo nos que apresentavam lesões, predominou a deteção de linfadenite purulenta, uma lesão característico da tentativa de reposição da imunidade, o qual é partilhado por diversas infeções (Motta *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos demonstraram, ainda, a existência de uma maior proporção de adultos infetados, em contraste com o número de juvenis. Este facto pode resultar de fatores subjacentes ao comportamento do animal, dentro da comunidade de cada espécie. Geralmente, nas comunidades selvagens, a manutenção e competição por território, bem como a procura ou caça de comida é levada a cabo pela população adulta, justificando a maior exposição ao agente dos animais deste grupo etário, quer por transmissão por possíveis feridas abertas, quer pelo contato com animais ou cadáveres infetados.

O último ponto a abordar na discussão relativa aos resultados obtidos na análise da infeção por *Nocardia* spp. é a sua abrangência em termos de território. De todos os concelhos onde foram recolhidas amostras, verificou-se uma a maior percentagem de infetados em Idanha-a-Nova, tornando-a, conseqüentemente, uma zona de maior risco, ou “zona quente” para a infeção por *Nocardia* spp. Uma hipótese que pode explicar este fato advém da posição geográfica e características do concelho. Situado na fronteira com Espanha, é um dos pontos de travessia entre os dois países. Para além disso, uma parte significativa do concelho está englobado no Parque Natural do Tejo Internacional, uma reserva natural, caracterizada pela vegetação abundante, rica fauna selvagem e pela presença de núcleos humanos mais tradicionais. Por estas razões, a disseminação de uma doença infecciosa poderia passar despercebida, com origem local ou além - fronteira e afectando, maioritariamente, as espécies de animais selvagens. Continuando, o agente poderia ser transmitido a humanos que permanecessem nos ditos núcleos tradicionais, nos quais, possivelmente, haveria uma menor vigilância, informação ou prevenção da infeção. Ao longo do tempo, poderia culminar em surtos da doença a nível local, e, mais tardiamente, em locais geograficamente mais afastados, sem esclarecimento óbvio da

relação entre local de origem e local de surto, ressaltando que uma percentagem de afetados seriam turistas.

6.2. *Francisella* spp.

Segundo Wang *et al.* (2011), os “primers” utilizados amplificariam uma sequência específica de *Francisella* spp. No entanto, o tamanho da sequência obtida foi menor que o reportado no artigo. A potencial presença desta bactéria só poderá ser confirmada após a análise dos resultados da sequenciação da banda obtida. Seguindo-se um alinhamento da sequência obtida com a informação disponível nas bases de dados, através de programas bioinformáticos, fornecendo a identificação do organismo que contém a sequência em análise. Isto esclarecerá se estamos a lidar com uma espécie menos reportada de *Francisella* spp., ou se se trata de outra bactéria.

Este potencial agente revelou estar aparentemente presente em diversos animais de distintas famílias taxonómicas, como Raposas Vermelhas (*Vulpes vulpes*), Javalis (*Sus scrofa*), Veados Vermelhos (*Cervus elaphus*) e Saca-rabos (*Herpestes ichneumon*). Sendo estes últimos carnívoros, remete para uma possível transmissão pela ingestão de produtos contaminados, e não só por contato direto ou via aérea.

A presença deste potencial patógeno em gânglios linfáticos mesentéricos e rins, sugere a entrada por mordedura ou por ingestão de produtos contaminados. Nos pulmões, a sua presença remete para a transmissão da bactéria pelas vias aéreas. A par dos órgãos afetados, a globalidade dos animais, que revelaram a presença do potencial agente, tinham lesões de linfadenite purulenta e granulomas caseo-calcários, ambos característicos da infeção por diferentes bactérias granulomatosas (Motta *et al.*, 2010). No entanto, de salientar o facto de, tal como visto para a *Nocardia* spp., uma grande parcela dos animais infetados não apresentavam lesões no exame *post mortem*.

De acordo com os resultados, o agente em estudo atingiu maior percentagem de machos juvenis, comparativamente às outras faixas etárias, propondo uma maior facilidade de contaminação em sistemas imunitários menos desenvolvidos, característicos de animais mais jovens, permitindo salientar o fato de este agente não colonizar o organismo, mas de ser capaz de provocar infeção ao mínimo contato. Além disto, a maioria dos animais infetados foram encontrados no concelho de Idanha – a – Nova. Tal como discutido para a *Nocardia* spp., as características naturais desta região são propícias à transmissão inter-espécies e à manutenção no habitat de diversas

6.Discussão

doenças zoonóticas, sendo passíveis de potencializar, dependendo do organismo, focos de infecção em humanos, cuja origem pode não ser óbvia ou fácil de atribuir.

7. Conclusões

Apesar de algumas possíveis limitações, os métodos de diagnóstico molecular, como a técnica de PCR, são uma forma precisa e rápida de identificar agentes patogénicos, sem a necessidade recorrente de cultivar a bactéria, especialmente após a otimização do processo e do teste de conjuntos de “primers” adequados e específicos.

Com este estudo foi possível verificar, com sucesso, a presença de *Nocardia* spp. e a potencial presença de *Francisella* spp., em diferentes amostras de órgãos e animais. Os resultados obtidos permitiram realizar um estudo epidemiológico local, possibilitando uma delimitação de áreas com maior risco de exposição, como foi o caso de Idanha-a-Nova. Os resultados deste trabalho evidenciam a relevância de uma vigilância constante destes agentes infecciosos, não só para prevenir infeções a humanos ou animais de interesse socioeconómicos ou de companhia, bem como prever a disseminação e evolução destes agentes num ambiente pouco controlado e, muitas vezes, negligenciado, como é o caso das reservas naturais e dos animais selvagens nesses *habitats*.

Quanto às bactérias abordadas, refere-se a falta de esclarecimento em muitos mecanismos associados à infeção e combate a estas bactérias. A forma como *Nocardia* spp. coloniza os pulmões e entra nas células ainda não se encontra descrita, sendo um conhecimento crucial para diagnóstico e para tratamento. No caso de *Francisella* spp., dado o seu estatuto de agente muito infeccioso, o estudo e a epidemiologia dos vetores associados à transmissão podem ser importantes para o desenvolvimento de terapias mais específicas, desfavorecendo a taxa de infeção e a evolução da resistência aos antibióticos e vacinas.

Em conclusão, denota-se a importância do investimento no diagnóstico de agentes zoonóticos, especialmente em animais selvagens, dado a falta de sinais clínicos ou lesões dos animais infetados, e a possibilidade de se propagarem de forma despercebida. Isto deve ser aplicado ao máximo de zoonoses possível, em estudos regulares e abrangentes no território nacional, de forma a avaliar a presença e distribuição das mesmas, bem como alertar as autoridades médicas e sanitárias para possíveis contaminações com agentes menos usuais. Isto possibilitaria um tratamento mais eficaz e direcionado, especialmente nas unidades médicas mais próximas das zonas de risco, e precaveria contra as perdas económicas avultadas associadas a surtos zoonóticos em animais de importância socioeconómica.

8.Bibliografia

- Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G., and Forsman, M. (2003). Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*, 69(1), 600-606.
- Abreu, C., Rocha-Pereira, N., Sarmento, A., and Magro, F. (2015). *Nocardia* infections among immunomodulated inflammatory bowel disease patients: A review. *World J Gastroenterol*, 21(21), 6491-6498.
- Adalja, A. A., Toner, E., and Inglesby, T. V. (2015). Clinical management of potential bioterrorism-related conditions. *N Engl J Med*, 372(10), 954-962.
- Afanas'ev, M. V., Mironova, L. V., and Balakhonov, S. V. (2015). Maldi-tof ms analysis for *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera*, and *Francisella tularensis* identification. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 33(2), 3-8.
- Alfaresi, M. and Elkosh, A. (2006). Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. *J Med Microbiol* 55(12): 1711-1715.
- Arjun, R., A. Padmanabhan, B. P. Reddy Attunuru and P. Gupta (2016). Disseminated nocardiosis masquerading as metastatic malignancy. *Lung India* 33(4): 434-438.
- Akimana, C., Al-Khodori, S., and Abu Kwaik, Y. (2010). Host factors required for modulation of phagosome biogenesis and proliferation of *Francisella tularensis* within the cytosol. *PLoS One*, 5(6), e11025.
- Ambrosioni, J., Lew, D., and Garbino, J. (2010). Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection*, 38(2), 89-97.
- Ariza-Miguel, J., Johansson, A., Fernández-Natal, MI., Martínez-Nistal, C., Orduña, A., Rodríguez-Ferri, E. F., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D. (2014). Molecular investigation of tularemia outbreaks, Spain, 1997-2008. *Emerg Infect Dis*, 20(5), 754-761.
- Bakshi, C. S., Malik, M., Regan, K., Melendez, J. A., Metzger, D. W., Pavlov, V. M., and Sellati, T. J. (2006). Superoxide dismutase B gene (sodB)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J Bacteriol*, 188(17), 6443-6448.
- Balagopal, A., MacFarlane, A. S., Mohapatra, N., Soni, S., Gunn, J. S., and Schlesinger, L. S. (2006). Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Infect Immun*, 74(9), 5114-5125.
- Barel, M., Ramond, E., Gesbert, G., and Charbit, A. (2015). The complex amino acid diet of *Francisella* in infected macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 9.
- Barroso, H.; Meliço-Silvestre, A. ; Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica* (Vol. 1): LIDEL.
- Beaman, B. L., and Beaman, L. (1994). *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev*, 7(2), 213-264.
- Beaman, B. L., and Scates, S. M. (1981). Role of L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infect Immun*, 33(3), 893-907.
- Beaman, B. L., and Sugar, A. M. (1983). *Nocardia* in naturally acquired and experimental infections in animals. *J Hyg (Lond)*, 91(3), 393-419.
- Bengis, R. G., Leighton, F. A., Fischer, J. R., Artois, M., Morner, T., and Tate, C. M. (2004). The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev Sci Tech*, 23(2), 497-511.

- Bergey, D. H., Krieg, N. R., and Holt, J. G. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: Williams and Wilkins.
- Betrán, A., C. Villuendas M^a, A. Rezusta, J. Pereira, J. Revillo M^a and V. Rodríguez-Nava (2016). Clinical significance, antimicrobial susceptibility and molecular identification of *Nocardia* species isolated from children with cystic fibrosis. *Braz J Microbiol* 47(3): 531-535.
- Biberstein, E. L., Jang, S. S., and Hirsh, D. C. (1985). *Nocardia asteroides* infection in horses: a review. *J Am Vet Med Assoc*, 186(3), 273-277.
- Birkbeck, T. H., Feist, S. W., and Verner-Jeffreys, D. W. (2011). *Francisella* infections in fish and shellfish. *J Fish Dis*, 34(3), 173-187.
- Blanchard, R. (1896). *Parasites animaux et parasites végétaux à l'exclusion des Bactéries*. Traité de pathologie générale. Paris, Masson.
- Boiron, P., Provost, F., Chevrier, G., and Dupont, B. (1992). Review of nocardial infections in France 1987 to 1990. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 11(8), 709-714.
- Brown-Elliott, B. A., Brown, J. M., Conville, P. S., and Wallace, R. J. (2006). Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, 19(2), 259-282.
- Buonfrate, D., Gobbi, F., Angheben, A., Marocco, S., Farina, C., Van Den Ende, J., and Bisoffi, Z. (2014). Autochthonous cases of mycetoma in Europe: report of two cases and review of literature. *PLoS One*, 9(6), e100590.
- Carella, F., Carrasco, N., Andree, K. B., Lacuesta, B., Furones, D., and De Vico, G. (2013). Nocardiosis in Mediterranean bivalves: first detection of *Nocardia crassostreae* in a new host *Mytilus galloprovincialis* and in *Ostrea edulis* from the Gulf of Naples (Italy). *J Invertebr Pathol*, 114(3), 324-328.
- Celli, J., and Zahrt, T. C. (2013). Mechanisms of *Francisella tularensis* Intracellular Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(4).
- Chikeka, I., and Dumler, J. S. (2015). Neglected bacterial zoonoses. *Clin Microbiol Infect*, 21(5), 404-415.
- Childs, J. E., and Gordon, E. R. (2009). Surveillance and control of zoonotic agents prior to disease detection in humans. *Mt Sinai J Med*, 76(5), 421-428.
- Chong, A., Wehrly, T. D., Nair, V., Fischer, E. R., Barker, J. R., Klose, K. E., and Celli, J. (2008). The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression. *Infect Immun*, 76(12), 5488-5499.
- Collins, F. M. (1996). *Pasteurella, Yersinia, and Francisella*. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston
- Condas, L. A., Ribeiro, M. G., Gonoï, T., Matsuzawa, T., Yazawa, K., Motta, R. G., Franco M. M., Listoni, F. J. (2012). Molecular identification and thermoresistance to boiling of *Nocardia farcinica* and *Nocardia cyriacigeorgica* from bovine bulk tank milk. *Braz J Microbiol*, 43(3), 1038-1041.
- Condas, L. A., Ribeiro, M. G., Yazawa, K., de Vargas, A. P., Salerno, T., Giuffrida, R., Langoni, H., Melville P.A., Biesdorf, S., Matsuzawa, T., Gonoï, T., Kastelic, J. P., Barkema, H. W. (2013). Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* spp. isolated from bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol*, 167(3-4), 708-712.
- Condas, L. A., Ribeiro, M. G., Muro, M. D., de Vargas, A. P., Matsuzawa, T., Yazawa, K., Siqueira, A. K., Salerno, T., Lara, G. H., Riseti, R. M., Ferreira,

- K. S., Gonoï, T. (2015). Molecular identification and antimicrobial resistance of seven clinical isolates *Nocardia* spp. in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 57(3), 251-256.
- Conville, P. S., Fischer, S. H., Cartwright, C. P., and Witebsky, F. G. (2000). Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*, 38(1), 158-164.
- Corti, M. E., and Villafane-Fiotti, M. F. (2003). Nocardiosis: a review. *Int J Infect Dis*, 7(4), 243-250.
- Cronquist, S. D. (2004). Tularemia: the disease and the weapon. *Dermatol Clin*, 22(3), 313-320, vi-vii.
- Cunha, B. A. (2002). Anthrax, tularemia, plague, ebola or smallpox as agents of bioterrorism: recognition in the emergency room. *Clin Microbiol Infect*, 8(8), 489-503.
- Cutler, S. J., Fooks, A. R., and van der Poel, W. H. (2010). Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis*, 16(1), 1-7.
- Dai, S., Mohapatra, N. P., Schlesinger, L. S., and Gunn, J. S. (2012). The acid phosphatase AcpA is secreted in vitro and in macrophages by *Francisella* spp. *Infect Immun*, 80(3), 1088-1097.
- Dennis, D. T., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., and *et al.* (2001). Tularemia as a biological weapon: Medical and public health management. *JAMA*, 285(21), 2763-2773.
- Domenis, L., Pecoraro, P., Spedicato, R., Corvonato, M., Peletto, S., Zuccon, F., and Acutis, P. (2009). *Nocardia otitidiscaviarum pneumonia* in an Alpine chamois (*Rupicapra rupicapra rupicapra*). *J Comp Pathol*, 141(1), 70-73.
- El-Etr, S. H., Margolis, J. J., Monack, D., Robison, R. A., Cohen, M., Moore, E., and Rasley, A. (2009). *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), 7488-7500.
- Ellis, J., Oyston, P. C. F., Green, M., and Titball, R. W. (2002). Tularemia. *Clin Microbiol Rev*, 15(4), 631-646.
- Emeruwa, A. C. (1986). Isolation and some properties of beta-hemolysin produced by *Nocardia asteroides*. *Mycopathologia*, 95(1), 29-35.
- Engelsma, M. Y., Roozenburg, I., and Joly, J. P. (2008). First isolation of *Nocardia crassostreae* from Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Europe. *Dis Aquat Organ*, 80(3), 229-234.
- Euzeby, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol*, 47(2), 590-592.
- Faulde, M., and Spiesberger, M. (2013). Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. *J Hosp Infect*, 83(1), 51-60.
- Foley, J. E., and Nieto, N. C. (2010). Tularemia. *Vet Microbiol*, 140(3-4), 332-338.
- Forestal, C. A., Malik, M., Catlett, S. V., Savitt, A. G., Benach, J. L., Sellati, T. J., and Furie, M. B. (2007). *Francisella tularensis* has a significant extracellular phase in infected mice. *J Infect Dis*, 196(1), 134-137.
- Gadaga, B. M., E. Etter, B. Mukamuri, K. J. Makwangudze, D. M. Pfukenyi and G. Matope (2015). Living at the edge of an interface area in Zimbabwe: cattle owners, commodity chain and health workers' awareness, perceptions and practices on zoonoses, *BMC Public Health*.

- Geier, H., and Celli, J. (2011). Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis*. *Infect Immun*, 79(6), 2204-2214.
- Georghiou, P. R., and Blacklock, Z. M. (1992). Infection with *Nocardia* species in Queensland. A review of 102 clinical isolates. *Med J Aust*, 156(10), 692-697.
- Gezuele, E. (1972). Fatal infection by *Nocardia brasiliensis* in an armadillo. *Sabouraudia*, 10(1), 63-65.
- Gordon, R. E. (1981). A proposed new status for *Nocardia asteroides*. *Zentralbl, Bakteriologie, Microbiologie Hygiene Abt. I.*, 11, 3-6.
- Gürcan, Ş. (2014). Epidemiology of Tularemia. *Balkan Med J*, 31(1), 3-10.
- Gurcan, S. (2007). *Francisella tularensis* and tularemia in Turkey. *Mikrobiyol Bul*, 41(4), 621-636.
- Gurycova, D. (1998). First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol*, 14(8), 797-802.
- Gyuranecz, M., K. Rigo, A. Dan, G. Foldvari, L. Makrai, B. Denes, L. Fodor, G. Majoros, L. Tirjak and K. Erdelyi (2011). Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an inter-epizootic period, *Vector Borne Zoonotic Dis* 11(8), 1031-1035.
- Halsby, K. D., Walsh, A. L., Campbell, C., Hewitt, K., and Morgan, D. (2014). Healthy Animals, Healthy People: Zoonosis Risk from Animal Contact in Pet Shops, a Systematic Review of the Literature. *PLoS One*, 9(2).
- Hestvik, G., Warns-Petit, E., Smith, L. A., Fox, N. J., Uhlhorn, H., Artois, M., Hannant, D., Hutchings, M. R., Mattsson, R., Yon, L., Gavier-Widen, D. (2015). The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiol Infect*, 143(10), 2137-2160.
- Huang, H., Lu, Z. W., and Xu, Z. J. (2010). Clinical analysis of 26 cases of nocardiosis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 33(9), 651-655.
- Johansson, A., and Petersen, J. M. (2010). Genotyping of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *JAOAC Int*, 93(6), 1930-1943.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., and Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993.
- Kalpole, J. S., Templeton, K. E., Horrevorts, A. M., Endtz, H. P., Kuijper, E. J., Bernards, A. T., and Klaassen, C. H. W. (2007). Molecular Typing of a Suspected Cluster of *Nocardia farcinica* Infections by Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses. *J Clin Microbiol*, 45(12), 4048-4050.
- Kamaishi, Takashi, Fukuda, Yutaka, Nishiyama, Masaru, Kawakami, Hidemasa, Matsuyama, Tomomasa, Yoshinaga, Tomoyoshi, and Oseko, Norihisa. (2005). Identification and Pathogenicity of Intracellular *Francisella* bacterium in Three-line Grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Fish Pathology*, 40(2), 67-71.
- Kandi, V. (2015). Human *Nocardia* Infections: A Review of Pulmonary Nocardiosis. *Cureus*, 7(8), e304.
- Karagoz, S., Kilic, S., Berk, E., Uzel, A., Celebi, B., Comoglu, S., Karagoz, A., Akyar, I., Can, S. (2013). *Francisella tularensis* bacteremia: report of two cases and review of the literature. *New Microbiol*, 36(3), 315-323.
- Kinde, H., Walker, R. L., Skinner, V. A., Daft, B. M., and Hughes, R. L. (1992). Actinomycetales infections in slender-horned gazelles: six cases (1987-1989). *J Am Vet Med Assoc*, 200(11), 1719-1722.

- Kirpensteijn, J. and R. B. Fingland (1992). Cutaneous actinomycosis and nocardiosis in dogs: 48 cases (1980-1990). *J Am Vet Med Assoc*, 201(6), 917-920.
- Kogure, T., R. Shimada, J. Ishikawa, K. Yazawa, J. M. Brown, Y. Mikami and T. Gono (2010). Homozygous Triplicate Mutations in Three 16S rRNA Genes Responsible for High-Level Aminoglycoside Resistance in *Nocardia farcinica* Clinical Isolates from a Canada-Wide Bovine Mastitis Epizootic, *Antimicrob Agents Chemother* 54(6); 2385-2390.
- Kolmodin, L. A. and D. E. Birch (2002). Polymerase Chain Reaction. *PCR Cloning Protocols*. B.-Y. Chen and H. W. Janes. Totowa, NJ, Humana Press: 3-18.
- Kormilitsyna, M. I., I. S. Meshcheriakova and T. V. Mikhailova (2013). The molecular and genetic characterization of *Francisella tularensis* strains of different taxonomic status and virulence. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* (3), 22-25.
- Larsson, P., P. C. Oyston, P. Chain, M. C. Chu, M. Duffield, H. H. Fuxelius, E. Garcia, G. Halltorp, D. Johansson, K. E. Isherwood, P. D. Karp, E. Larsson, Y. Liu, S. Michell, J. Prior, R. Prior, S. Malfatti, A. Sjostedt, K. Svensson, N. Thompson, L. Vergez, J. K. Wagg, B. W. Wren, L. E. Lindler, S. G. Andersson, M. Forsman and R. W. Titball (2005). The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet* 37(2), 153-159.
- Laurent, F. J., F. Provost and P. Boiron (1999). "Rapid Identification of Clinically Relevant *Nocardia* Species to Genus Level by 16S rRNA Gene PCR." *J Clin Microbiol* 37(1), 99-102.
- Lerner, P. I. (1996). Nocardiosis. *Clin Infect Dis* 22(6), 891-903;.
- Li, S., Song, X. Y., Zhao, Y. Y., Xu, K., Bi, Y. L., Huang, H., and Xu, Z. J. (2015). Clinical Analysis of Pulmonary Nocardiosis in Patients With Autoimmune Disease. *Medicine (Baltimore)*, 94(39), e1561.
- Li, Z., Clemens, D. L., Lee, B. Y., Dillon, B. J., Horwitz, M. A., and Zink, J. I. (2015). Mesoporous Silica Nanoparticles with pH-Sensitive Nanovalves for Delivery of Moxifloxacin Provide Improved Treatment of Lethal Pneumonic Tularemia. *ACS Nano*.
- Lopes de Carvalho, I., Escudero, R., García-Amil, C., Falcão, H., Anda, P., and Nuncio, M. S. (2007). *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 13(4), 666-667.
- Lopes de Carvalho, I., Nuncio, M. S., and David de Morais, J. (2009). Tularemia. *Acta Med Port*, 22(3), 281-290.
- Lubbert, C., Taeye, C., Seufferlein, T., and Grunow, R. (2009). Prolonged course of tick-borne ulceroglandular tularemia in a 20-year-old patient in Germany--case report and review of the literature. *Dtsch Med Wochenschr*, 134(27), 1405-1410.
- Luque-Larena, J. J., Mougeot, F., Roig, D. V., Lambin, X., Rodriguez-Pastor, R., Rodriguez-Valin, E., Anda, P., Escudero, R. (2015). Tularemia Outbreaks and Common Vole (*Microtus arvalis*) Irruptive Population Dynamics in Northwestern Spain, 1997-2014. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 15(9), 568-570.
- MacLean-Fletcher, S., and Pollard, T. D. (1980). Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell*, 20(2), 329-341.
- Maldonado, L. A., Hamid, M. E., Gamal El Din, O. A., and Goodfellow, M. (2004). *Nocardia farcinica* - a significant cause of mastitis in goats in Sudan. *J S Afr Vet Assoc*, 75(3), 147-149.

- Maraha, B., Hajer, G., Sjödin, A., Forsman, M., Paauw, A., Roeselers, G., Verspui, E., Frenay, I., Notermans, D., de Vries, M., Reubsaet, F. (2013). Indigenous Infection with *Francisella tularensis holarctica* in The Netherlands. *Case Rep Infect Dis*, 2013, 916985.
- Matos, A. C., Dias, A. P., Morais, M., Matos, M., Pinto, M. L., Coelho, A. C., and Figueira, L. (2015). Granulomatous lymphadenitis caused by *Nocardia* species in hunted wild boar (*Sus scrofa*) in Portugal. *Veterinary Record*, 177(4), 103-104.
- McCaffrey, R. L., Schwartz, J. T., Lindemann, S. R., Moreland, J. G., Buchan, B. W., Jones, B. D., and Allen, L. A. (2010). Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. *J Leukoc Biol*, 88(4), 791-805.
- McNeil, M. M., and Brown, J. M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 7(3), 357-417.
- Melillo, A. A., Mahawar, M., Sellati, T. J., Malik, M., Metzger, D. W., Melendez, J. A., and Bakshi, C. S. (2009). Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J Bacteriol*, 191(20), 6447-6456.
- Meslin, F. X., Stohr, K., and Heymann, D. (2000). Public health implications of emerging zoonoses. *Rev Sci Tech*, 19(1), 310-317.
- Miller, M. and F. Olea-Popelka (2013). One Health in the shrinking world: experiences with tuberculosis at the human-livestock-wildlife interface. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36(3), 263-268.
- Mootsikapun, P., Intarapoka, B., and Liawnoraset, W. (2005). Nocardiosis in Srinagarind Hospital, Thailand: review of 70 cases from 1996-2001. *Int J Infect Dis*, 9(3), 154-158.
- Morner, T. (1992). The ecology of tularaemia. *Rev Sci Tech*, 11(4), 1123-1130.
- Motta, R. G., A. d. C. M. Cremasco and M. G. Ribeiro (2010). Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. 2010 17(2), 14.
- Muricy, E. C., Lemes, R. A., Bombarda, S., Ferrazoli, L., and Chimara, E. (2014). Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: Critical aspects for bacteriological diagnosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 56(5), 397-401.
- Murphy, F. A. (2008). Emerging zoonoses: the challenge for public health and biodefense. *Prev Vet Med*, 86(3-4), 216-223.
- Nocard, Edmond. (1888). Note sur la maladie des boeufs de la Guadeloupe, connue sous le nom de farcin. *Annales de l'Institut Pasteur*, 2, 293-302.
- O'Brien, K. K., Higdon, M. L., and Halverson, J. J. (2003). Recognition and management of bioterrorism infections. *Am Fam Physician*, 67(9), 1927-1934.
- Otto, P., Kohlmann, R., Müller, W., Julich, S., Geis, G., Gatermann, S.G., Peters, M., Wolf, P.J., Karlsson, E., Forsman, M., Myrtenäs, K., Tomaso, H. (2015). Hare-to-Human Transmission of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Germany. *Emerg Infect Dis*, 21(1), 153-155.
- Osiak, B., Bartoszcze, M., and Gawel, J. (2006). *Francisella tularensis* - feature of pathogen, pathogenesis, diagnostics. *Przegl Epidemiol*, 60(3), 601-608.
- Oyston, P. C., Sjøstedt, A., and Titball, R. W. (2004). Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol*, 2(12), 967-978.

- Park, F. J., and Jaensch, S. (2009). Unusual multifocal granulomatous disease caused by actinomycetous bacteria in a nestling Derbyan parrot (*Psittacula derbiana*). *Aust Vet J*, 87(1), 63-65.
- Pearce-Duvel, J. M. (2006). The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 81(3), 369-382.
- Petersen, J. M., Mead, P. S., and Schriefer, M. E. (2009). *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res*, 40(2), 7.
- Petersen, J. M., and Molins, C. R. (2010). Subpopulations of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and *holarctica*: identification and associated epidemiology. *Future Microbiol*, 5(4), 649-661.
- Pintado, V., Gómez-Mampaso, E., Fortún, J., Meseguer, M. A., Cobo, J., Navas, E., Quereda, C., Martín-Dávila, P., Moreno, S. (2002). Infection with *Nocardia* species: clinical spectrum of disease and species distribution in Madrid, Spain, 1978-2001. *Infection*, 30(6), 338-340.
- Porsch-Ozcurumez, M., Kischel, N., Priebe, H., Splettstosser, W., Finke, E. J., and Grunow, R. (2004). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(6), 1008-1015.
- Prior, R. G., Klasson, L., Larsson, P., Williams, K., Lindler, L., Sjostedt, A., Titball, R. W. (2001). Preliminary analysis and annotation of the partial genome sequence of *Francisella tularensis* strain Schu 4. *J Appl Microbiol*, 91(4), 614-620.
- Qu, P. H., Chen, S. Y., Scholz, H. C., Busse, H. J., Gu, Q., Kampfer, P., Foster, J. T., Glaeser, S.P., Chen, C., Yang, Z. C. (2013). *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 10), 3628-3635.
- Ramiro-Puig, E., F. Pérez-Cano, C. Castellote, A. Franch and M. Castell (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Rev Esp Enferm Dig* 100(1), 29-34.
- Ribeiro, M. G., Salerno, T., Mattos-Guaraldi, A. L., Camello, T. C., Langoni, H., Siqueira, A. K., Paes, A. C., Fernandes, M. C., Lara, G. H. (2008). Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 50(3), 177-185.
- Rodrigues, C., Costa, T., Martins, V., e Matos, F. (2009). Nocardiose torácica. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 15, 1199-1204.
- Rodríguez-Nava, V., Couble, A., Khan, Z. U., Pérouse de Montclos, M., Brasme, L., Villuendas, C., Molinard C., Boiron, P., Laurent, F. (2005). *Nocardia ignorata*, a New Agent of Human Nocardiosis Isolated from Respiratory Specimens in Europe and Soil Samples from Kuwait. *J Clin Microbiol*, 43(12), 6167-6170.
- Roth, A., Andrees, S., Kroppenstedt, R. M., Harmsen, D., and Mauch, H. (2003). Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J Clin Microbiol*, 41(2), 851-856.
- Rowe, H. M. and Huntley, J. F. (2015). From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence, *Front Cell Infect Microbiol*, 94, 5.
- Santiago, A. E., B. J. Mann, A. Qin, A. L. Cunningham, L. E. Cole, C. Grassel, S. N. Vogel, M. M. Levine and E. M. Barry (2015). "Characterization of

- Francisella tularensis* Schu S4 defined mutants as live-attenuated vaccine candidates.", *Pathog Dis*, 73, 6.
- Saubolle, M. A., and Sussland, D. (2003). Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *J Clin Microbiol*, 41(10), 4497-4501.
- Schmitt, P., Splettstosser, W., Porsch-Ozcurumez, M., Finke, E. J., and Grunow, R. (2005). A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol Infect*, 133(4), 759-766.
- Sellek, R., O. Jimenez, C. Aizpurua, B. Fernandez-Frutos, P. De Leon, M. Camacho, D. Fernandez-Moreira, C. Ybarra and J. Carlos Cabria (2008). Recovery of *Francisella tularensis* from soil samples by filtration and detection by real-time PCR and cELISA. *J Environ Monit* 10(3), 362-369.
- Seo, J. P., and Lee, S. D. (2006). *Nocardia harenae* sp. nov., an actinomycete isolated from beach sand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(Pt 9), 2203-2207.
- Seo, J. P., Yun, Y. W., and Lee, S. D. (2007). *Nocardia spelunca* sp. nov., isolated from a cave. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 12), 2932-2935.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., and Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*, 6, 791.
- Sjostedt, A. (2007). Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci*, 1105, 1-29.
- Sobolewska-Pilarczyk, M., Pawlowska, M., and Halota, W. (2014). Ulceroglandular tularemia complicated by pneumonia - a case report. *Przegl Epidemiol*, 68(3), 421-424, 531-424.
- Spickler, Anna Rovid. "Tularemia", 2009.
- St-Leger, J. A., Begeman, L., Fleetwood, M., Frasca, S., Garner, M. M., Lair, S., Trembley, S., Linn, M. J. and Terio, K. A. (2009). Comparative pathology of nocardiosis in marine mammals. *Vet Pathol*, 46(2), 299-308.
- Taj-Aldeen, S. J., Deshmukh, A., Doiphode, S., Wahab, A. A., Allangawi, M., Almuzrkchi, A., Klaassen, C. H. and Meis, J. F. (2013). Molecular identification and susceptibility pattern of clinical *Nocardia* species: Emergence of *Nocardia crassostreae* as an agent of invasive nocardiosis. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 24(2), e33-38.
- Tan, C. K., Lai, C. C., Lin, S. H., Liao, C. H., Chou, C. H., Hsu, H. L., Huang, Y. T. and Hsueh, P. R. (2010). Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis including those caused by emerging *Nocardia* species in Taiwan, 1998-2008. *Clin Microbiol Infect*, 16(7), 966-972.
- Trevisanato, S. I. (2007). The 'Hittite plague', an epidemic of tularemia and the first record of biological warfare. *Med Hypotheses*, 69(6), 1371-1374.
- Torres, R. D., C. A. Oletta and H. Zlotnik (1996). "A rapid and gentle method for isolation of genomic DNA from pathogenic *Nocardia* spp." *Clin Diagn Lab Immunol* 3(5): 601-604.
- Uehara, A., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Kusumoto, S., Fukase, K., and Takada, H. (2006). Meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine, amino acids specific to bacterial peptidoglycans, activate human epithelial cells through NOD1. *J Immunol*, 177(3), 1796-1804.
- Uhde, K. B., Pathak, S., McCullum, I., Jr., Jannat-Khah, D. P., Shadomy, S. V., Dykewicz, C. A., Clark, T. A., Smith, T. L. and Brown, J. M. (2010). Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, United States, 1995-2004. *Clin Infect Dis*, 51(12), 1445-1448.

- Ulu-Kilic, A., and Doganay, M. (2014). An overview: tularemia and travel medicine. *Travel Med Infect Dis*, 12(6 Pt A), 609-616.
- Vemireddi, V., Sharma, A., Wu, C. C., and Lin, T. L. (2007). Systemic nocardiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *J Vet Diagn Invest*, 19(3), 326-329.
- Vogler, A. J., Birdsell, D., Price, L. B., Bowers, J. R., Beckstrom-Sternberg, S. M., Auerbach, R. K., Beckstrom-Sternberg, J. S., Johansson, A., Clare, A., Buchhagen, J. L., Petersen, J. M., Pearson, T., Vaissaire, J., Dempsey, M. P., Foxall, P., Engelthaler, D. M., Wagner, D. M., Keim, P. (2009). Phylogeography of *Francisella tularensis*: Global Expansion of a Highly Fit Clone. *J Bacteriol*, 191(8), 2474-2484.
- Wallis, R. S., Broder, M. S., Wong, J. Y., Hanson, M. E., and Beenhouwer, D. O. (2004). Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis*, 38(9), 1261-1265.
- Wang, H. L., Seo, Y. H., LaSala, P. R., Tarrand, J. J., and Han, X. Y. (2014). Nocardiosis in 132 patients with cancer: microbiological and clinical analyses. *Am J Clin Pathol*, 142(4), 513-523.
- Wang, Y., R. Hai, Z. Zhang, L. Xia, H. Cai, Y. Liang, X. Shen and D. Yu (2011). Genetic relationship between *Francisella tularensis* strains from China and from other countries. *Biomed Environ Sci* 24(3), 310-314.
- Welsh, O., Vera-Cabrera, L., and Salinas-Carmona, M. C. (2013). Current treatment for *Nocardia* infections. *Expert Opin Pharmacother*, 14(17), 2387-2398.
- Wilson, J. W. (2012). Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *Mayo Clin Proc*, 87(4), 403-407.
- Wongthim, S., Charoenlap, P., Udompanich, V., Punthumchinda, K., and Suwanagool, P. (1991). Pulmonary nocardiosis in Chulalongkorn Hospital. *J Med Assoc Thai*, 74(5), 271-277.
- Yang, M., Xu, M., Wei, W., Gao, H., Zhang, X., Zhao, H., Hu, J., Dong, H., Xu, L., and Li, L. (2014). Clinical findings of 40 patients with nocardiosis: A retrospective analysis in a tertiary hospital. *Exp Ther Med*, 8(1), 25-30.
- Yildiz, O., and Doganay, M. (2006). Actinomycoses and *Nocardia* pulmonary infections. *Curr Opin Pulm Med*, 12(3), 228-234.