

Tuberculose animal: diagnóstico, epidemiologia, investigação e controlo

A tuberculose animal é uma doença infeciosa crónica de progressão lenta que afeta bovinos e outras espécies de mamíferos, podendo também afetar o Homem. Na Península Ibérica, a doença é mantida num sistema multi-hospedeiro, no qual os agentes etiológicos, *Mycobacterium bovis* e *M. caprae*, circulam de forma endémica em populações de ungulados selvagens e domésticos.

Portugal tem registado progressos expressivos no controlo da doença desde a implementação à escala nacional do programa de erradicação, no entanto, subsistem vários aspetos por investigar na interface bovinos-fauna silvestre e são necessárias medidas de intervenção adaptadas a cada cenário epidemiológico.

Mónica V. Cunha, Ana C. Reis, André C. Pereira, Beatriz Ramos, Teresa Albuquerque e Ana Botelho
INIAV, I.P.



Nuno Santos . CIBIO-UP



Tuberculose animal

A tuberculose animal (TB) é uma doença infeciosa causada por *Mycobacterium bovis* e, menos frequentemente, por *Mycobacterium caprae*, que tipicamente afeta bovinos. Esta bactéria pode infetar várias outras espécies de ungulados domésticos e também selvagens, carnívoros ou marsupiais, com prevalências que variam consoante a região geográfica, a composição da comunidade de vertebrados e o manejo. Esta doença de progressão lenta pode apresentar longos períodos de latência, no entanto, em condições de imunossupressão do hospedeiro, pode evo-

luir para um quadro agudo, altamente contagioso, pela eliminação de micobactérias viáveis através de excreções e secreções. O quadro clínico é caracterizado pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas purulentas, caseosas e/ou caseocalcárias, onde ocorre infiltração linfocitária e, tipicamente, circunscrição do agente etiológico. Estas lesões situam-se, sobretudo, na cadeia linfática, com afinidade para linfonodos e/ou órgãos específicos consoante a espécie. Quando as lesões se localizam no aparelho respiratório, o contágio ocorre por via oronasal, entre animais que contactem entre si, no entanto, a bactéria pode também ser excretada pelo sistema digestivo/excretor através de fezes e urina que podem contaminar o solo, vegetação ou água, favorecendo a transmissão indireta via ambiente, nomeadamente pontos de alimentação ou de abeberamento e pastagens. No caso dos animais selvagens ou dos animais criados em regime extensivo, o contacto pode intensificar-se na época de estiagem

devido à redução dos pontos de água, conduzindo a maior agregação animal e maior probabilidade de transmissão.

Implicações da tuberculose bovina na saúde animal, segurança alimentar e socioeconomia

A tuberculose em bovinos raramente apresenta sinais clínicos específicos, apesar de se poder registar uma deterioração progressiva da condição corporal e emaciação do animal afetado. Face à inespecificidade de sinais, o controlo da doença consiste na deteção precoce e remoção atempada dos animais infetados para minimizar a transmissão do agente aos restantes.

Esta é uma doença de notificação obrigatória, que constitui risco para a saúde pública, e cujo agente pode ser transmitido ao Homem através da ingestão de alimentos de origem animal contaminados, nomeadamente leite não pasteurizado e carne pouco cozinhada, ou pelo contacto direto com animais infetados. Neste âmbito, os produtores

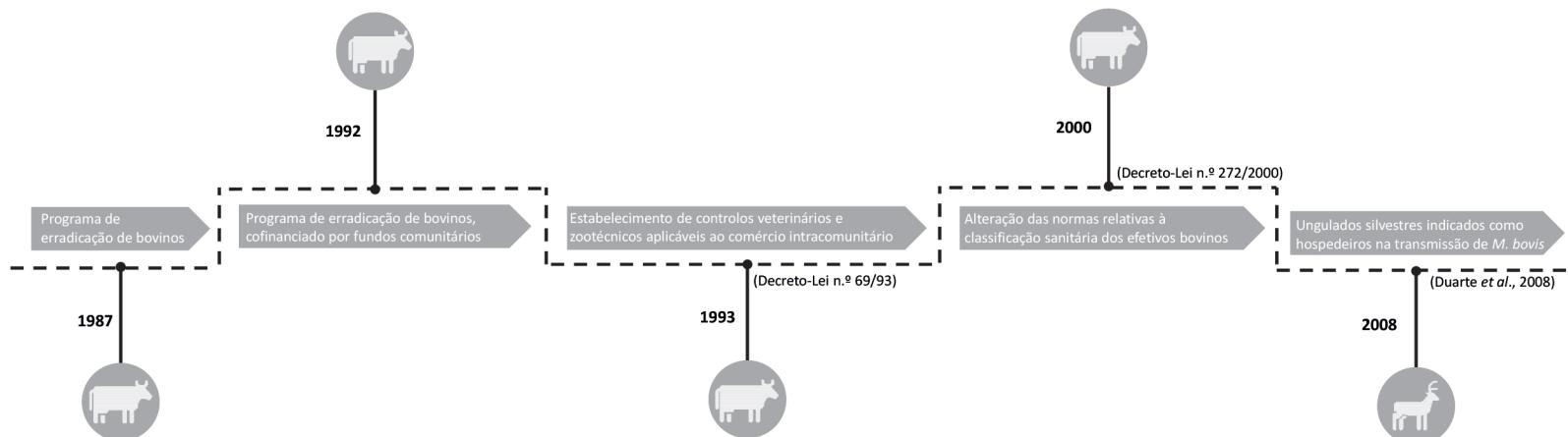


Figura 1 – Principais marcos na investigação e controlo de tuberculose animal em Portugal

pecuários, agricultores, profissionais de matadouro e caçadores estão entre os grupos com maior risco de contrair a infecção. Apesar das diversas medidas em curso que visam a erradicação da tuberculose bovina, do melhoramento das condições de manejo pecuário e da pasteurização do leite, que contribuíram para diminuir a transmissão ao Homem, todos os anos são reportados casos de tuberculose humana de origem zoonótica em países da União Europeia.

A tuberculose animal representa elevado impacto económico, devido às elevadas perdas de produção pecuária e de rejeição de carcaças em matadouro. Este problema é transversal a diferentes explorações de bovinos, independentemente da sua aptidão (leite, carne ou reprodução). Impacta também, com menor expressão, as explorações de caprinos e ovinos, suscetíveis à infecção por *Mycobacterium caprae*. A TB causa ainda a perda de mercados internos e externos da União Europeia, por restrição do comércio de animais e produtos derivados e pelo custo direto do controlo da doença para os orçamentos de alguns Estados-Membros, incluindo Portugal, onde existe um plano de erradicação em curso.

Programa de controlo de tuberculose nos bovinos

Portugal tem um programa de erradicação de tuberculose nos bovinos desde 1987 (Fig. 1), baseado no teste e abate dos efetivos, cuja responsabilidade de implementação e acompanhamento é da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Este programa assenta: (1) na deteção em vida de animais infetados nas explorações através da prova de intradermotuberculinação dupla comparada (IDTC) ou o teste do interferão-gama; (2) no abate sanitário compulsivo dos animais suspeitos com respectiva indemnização aos produtores; e (3)

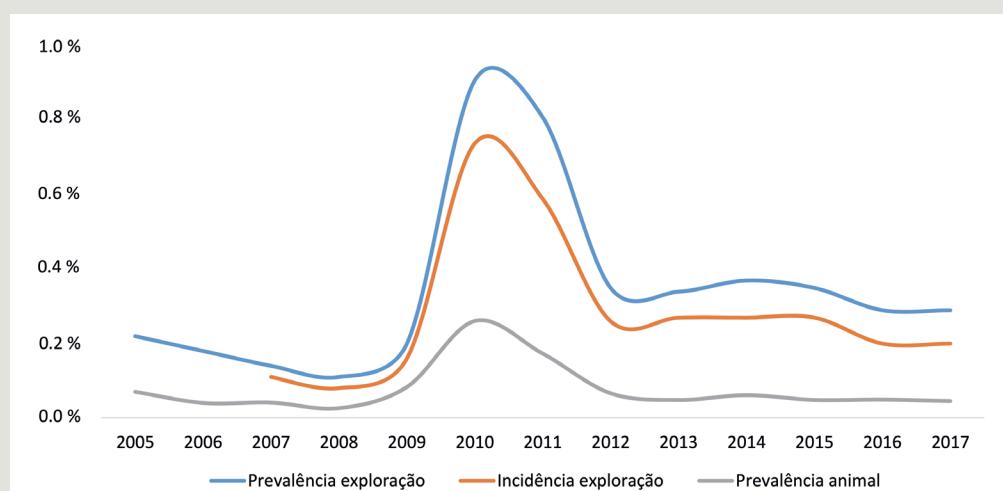


Figura 2 – Evolução dos indicadores epidemiológicos relativos à tuberculose em bovinos, em Portugal continental (2005 e 2017) [Adaptado do Relatório Técnico de Sanidade Animal, DGAV (2017)]

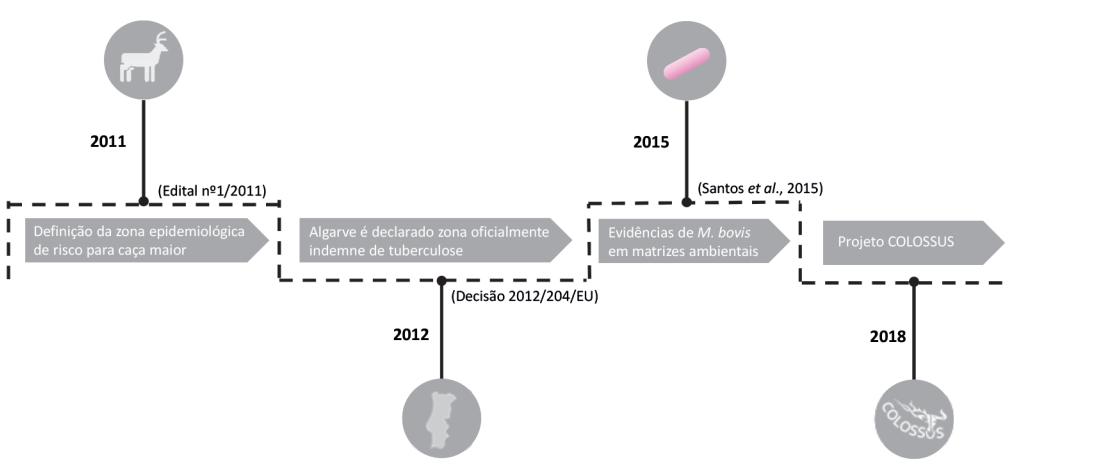
no diagnóstico laboratorial subsequente. Existem outras medidas adicionais, como os testes de pré-movimentação, a vigilância sanitária em matadouro e a classificação sanitária obrigatória dos efetivos e regiões. Portugal tem registado progressos expressivos no controlo da doença desde a implementação à escala nacional do programa de erradicação aprovado pela União Europeia em 1992 (Decisão do Conselho 92/299/CE) (Fig. 2). Os valores de prevalência têm permanecido baixos na última década, evidenciando-se algumas diferenças regionais entre a região Norte, com valores percentuais de prevalência mais baixos, em comparação com as regiões Centro e Alentejo (dados de 2017, DGAV). A região do Algarve é a única reconhecida, desde 2012, como região oficialmente indemne de tuberculose (Decisão 2012/204/EU), sendo aplicado um plano de vigilância específico para a manutenção deste estatuto.

Com a diminuição progressiva dos níveis de prevalência ao longo dos anos, alcançada através do programa de erradicação, a vigilância ativa da tuberculose bovina é atual-

mente ajustada à realidade epidemiológica das diferentes regiões, bem como ao histórico e aptidão das explorações. Para um controlo eficiente da doença, o rigor de aplicação e interpretação da prova de IDTC é de importância crucial para a deteção precoce e efetiva dos animais infetados e implementação das medidas de controlo necessárias, evitando assim a propagação do agente infeccioso e protegendo a saúde pública.

Tuberculose no mundo

O progressivo controlo da tuberculose animal, através de rigorosas campanhas de teste e abate dos bovinos infetados, permitiu tornar vários países oficialmente indemnes (e.g. Alemanha e França), circunscrevê-la a algumas regiões (e.g. Itália) ou baixar os níveis de prevalência para valores residuais (e.g. Bulgária ou Roménia). Contudo, quando a infecção se instala em populações silvestres, como o texugo (*Meles meles*) no Reino Unido e Irlanda, javali (*Sus scrofa*) e veado (*Cervus elaphus*) na Península Ibérica, o marsupial opossum (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia, o búfalo-africano na África do Sul (*Syncerus caffer*) e o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) nos Estados Unidos da América, a sua eliminação torna-se mais complexa e desafiante, conduzindo à necessidade de combinar diferentes estratégias de intervenção, desde o reforço da biossegurança à eliminação massiva de animais em áreas infetadas, ou à vacinação em zonas-piloto. Os estudos publicados sugerem que a vacinação diminui os níveis de excreção, mas não evita o estabelecimento da infecção. A vacinação de bovinos é proibida na União Europeia, uma vez que interfere com os métodos de diagnóstico, nomeadamente o teste de IDTC usado em vida. A administração da vacina na fauna silvestre é também



atualmente interdita na União Europeia, apesar de terem sido autorizados alguns estudos-piloto, que implicam validar um sistema de administração e distribuição da vacina, bem como a avaliação do seu impacto ambiental.

Tuberculose em caça maior em Portugal

A TB é uma doença emergente nos ungulados silvestres em Portugal, sendo a expansão a partir do núcleo de alta prevalência no centro-sudoeste da Península Ibérica alimentado pelas elevadas densidades destas espécies, as quais são promovidas pelo manejo intensivo para fins económicos associados ao turismo cinegético e comercialização de carne de caça. Este tipo de manejo inclui remoção de predadores, confinamento (cercados), translocação, alimentação e abeberamento artificiais, que sustentam a transmissão animal a animal. Para além das implicações óbvias em saúde animal, saúde pública e biodiversidade, a manutenção da tuberculose em espécies cinegéticas causa também avultados danos no turismo cinegético, no comércio da carne de caça e põe em causa o valor cultural, recreativo e económico das montarias e dos outros processos de caça dirigidos aos ungulados cinegéticos.

A vigilância irregular e não uniforme no país, contudo continuada nalgumas regiões, nomeadamente no Alentejo e Beira Interior, particularmente no concelho de Idanha-a-Nova, evidenciou uma incidência crescente de lesões suspeitas, confirmadas laboratorialmente, em caça maior (veados e javalis). Esta evidência, associada à elevada densidade e expansão geográfica das populações de ungulados silvestres, levou a que a DGAV estabelecesse em 2011 uma área epidemiológica de risco, através da publicação do Edital n.º 1/2011. A zona de risco inicialmente estabelecida compreende concelhos das unidades territoriais do Centro e Alentejo, estendendo-se ao longo da região raiana. A aplicação do Edital obriga a medidas específicas, nomeadamente o exame inicial dos animais de caça maior abatidos em ato venatório por um médico veterinário designado, para identificação de lesões sugestivas de tuberculose, recolha de amostras dos animais suspeitos (com lesões macroscópicas) para diagnóstico laboratorial e encaminhamento e eliminação adequados de subprodutos e das peças de caça suspeitas. Este exame inicial tem como principal objetivo detetar sinais que possam indicar que o consumo ou manuseamento do animal constitui um risco sa-

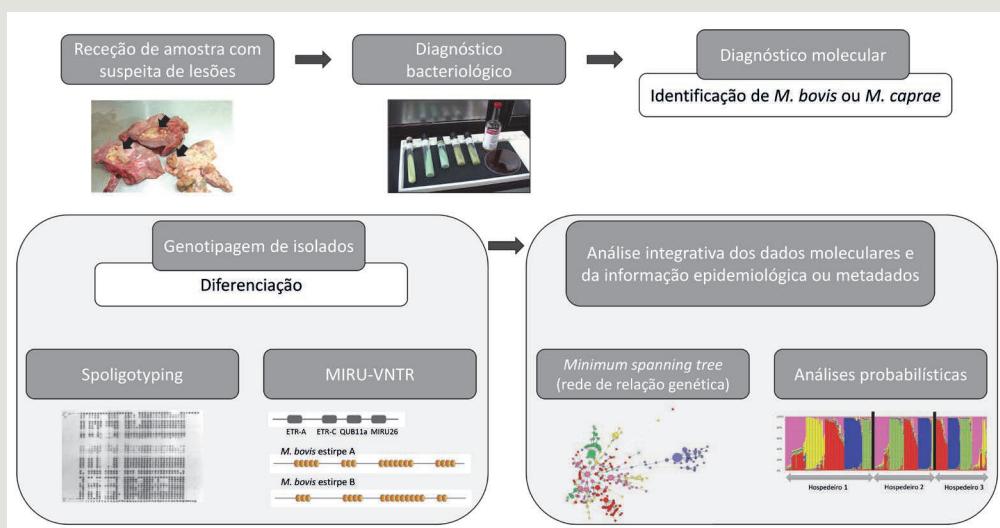


Figura 3 – Fluxograma para análise molecular dos processos epidemiológicos subjacentes a tuberculose animal: Receção de amostras com suspeitas de infecção tuberculosa, que são processadas para cultura em meio seletivo tendo em vista o crescimento preferencial de micobactérias. As colónias de micobactérias são processadas para extração de ADN, que posteriormente é utilizado em técnicas de biologia molecular para identificação da espécie (*M. bovis* ou *M. caprae*). Os isolados identificados são genotipados por técnicas clássicas (spoligotyping e MIRU-VNTR), baseadas em zonas específicas do genoma, e analisados por métodos baseados em filogenética e análise probabilística para determinar a relação evolutiva dos isolados e a sua relação espaco-temporal

nitário. O animal com lesões suspeitas deve ser eliminado para salvaguarda da segurança alimentar e saúde pública. O exame inicial não substitui a inspeção sanitária. Assim, a colocação no mercado para consumo humano de espécimes de caça maior abatidos em ato venatório obriga ao seu encaminhamento para um estabelecimento de preparação de caça aprovado ou matadouro licenciado para esse efeito, onde se efetuará uma inspeção sanitária por médico veterinário oficial.

O diagnóstico laboratorial

A execução analítica dos planos oficiais de controlo de TB em bovinos e caça maior (veado e javali) na área epidemiológica de risco é realizada pelo INIAV, IP, Laboratório Nacional de Referência de Saúde Animal, que tem a seu cargo a confirmação laboratorial dos casos suspeitos, baseada em testes histopatológicos, bacteriológicos, moleculares e/ou imunológicos (Fig. 3). Para um diagnóstico definitivo de tuberculose, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) exige a confirmação laboratorial oficial através do isolamento da bactéria em cultura e/ou deteção da bactéria em microgranulomas através do exame microscópico de lesões características nos tecidos. O isolamento em cultura do agente, realizado em condições de biossegurança elevadas, é um processo demorado (que pode exceder três meses) devido ao crescimento muito lento do microrganismo, com implicações evidentes no sequestro sanitário das carcaças e explorações suspeitas. Assim, o desenvolvimento e validação de métodos de diagnóstico mais rápidos, sensíveis e fiáveis,

que permitam agilizar o algoritmo de diagnóstico, a comunicação dos resultados e, subsequentemente, reduzir o sequestro sanitário das explorações, têm elevada relevância e prioridade.

Investigação nesta temática em Portugal

A par do apoio laboratorial à execução dos planos de controlo, o INIAV e outras equipas têm realizado estudos científicos que permitiram confirmar a circulação endémica de *M. bovis* em caça maior. A modelação espacial do risco de infecção com base em métodos sorológicos, usando o javali como espécie-modelo, e estudos não publicados em carnívoros mediterrânicos evidenciam a tendência de expansão geográfica da TB para além dos limites estabelecidos na área epidemiológica de risco.

Apesar da deteção ocasional do agente noutras espécies, nomeadamente carnívoros e aves necrófagas, os estudos realizados permitiram confirmar os bovinos, o javali e o veado como os hospedeiros de grande relevância epidemiológica.

Os estudos liderados pelo INIAV em parceria com a DGAV permitiram sustentar a investigação epidemiológica de surtos em explorações e casos de reinfeção após vazio sanitário associados a movimentação animal. Têm ainda salientado a elevada diversidade genotípica de *M. bovis* nas espécies de ungulados do território nacional e mostrado a existência de genótipos comuns com os de surtos ocorridos em Espanha. O INIAV tem ainda colaborado com várias entidades no estudo da dinâmica de movimentos de bovinos de explorações positivas

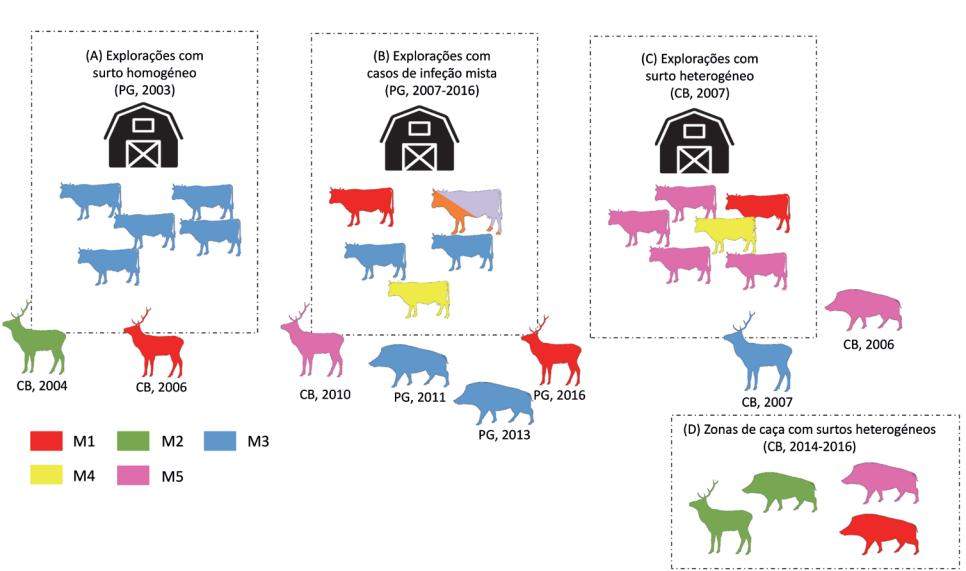


Figura 4 – Ilustração esquemática dos diferentes níveis de complexidade epidemiológica à escala individual, populacional e regional. Os hospedeiros estão identificados pelas cores das populações ancestrais, com exceção do caso de infecção mista. CB – Castelo Branco; PG – Portalegre

e a sua relação com parâmetros de análise genética e de distância (Fig. 4).

Outros estudos recentes também realizados em Portugal, nomeadamente pelo ICVS/Universidade do Minho e pelo CIBIO, e em Espanha sugerem que a contaminação e resiliência ambientais de *M. bovis* possam ter um papel importante na transmissão indireta, no entanto, a ausência de técnicas sensíveis e escaláveis tem impedido o isolamento de *M. bovis* de matrizes ambientais, bem como limitado a deteção da assinatura molecular das estirpes que circulam nessa interface. Também foi demonstrada a existência de javalis e veados superexcretores, que libertam no ambiente grandes quantidades de micobactérias por via oral, fecal e urinária, e que exercem um papel epidemiológico de enorme relevância, amplificando os processos de transmissão direta e indireta.

Os estudos científicos levados a cabo têm sido importantes para se conhecer e caracterizar a situação da TB no terreno e para que se possam adequar medidas de controlo sanitário às zonas onde comprovadamente *M. bovis* circula. Apesar da mitigação de alguns fatores de risco ao nível das explorações pelo manejo e reforço de medidas de biossegurança, a existência de reservatórios silvestres e as densidades elevadas de algumas populações geridas artificialmente para fins cinegéticos limitam grandemente o controlo de TB em Portugal e outros países europeus.

Evidências fornecidas por estudos de epidemiologia molecular em *M. bovis*

O INIAV foi pioneiro na caracterização molecular dos isolados nacionais de *M. bovis*

por spoligotyping e MIRU-VNTR, duas técnicas de referência internacionalmente aceites para a genotipagem de micobactérias (Fig. 3 e 4). Tem, desde 2008, e com regularidade, determinado o perfil genotípico de isolados oriundos de várias espécies animais do território continental e dos Açores, confirmando a predominância do clone Europeu 2 e identificando vários genótipos e clades não anteriormente descritos. A caracterização molecular de *M. bovis* de diferentes cenários epidemiológicos e contextos espaciotemporais suporta a ocorrência de episódios de transmissão intra e interestespecífica, quer à escala da exploração, quer à escala da zona de caça. Estas evidências são sugeridas pela sobreposição de perfis moleculares e a relação genética próxima entre isolados de diferentes hospedeiros, que partilham o mesmo contexto epidemiológico

co. Têm ainda sido identificadas algumas situações de infecções mistas ou detetada a ocorrência de fenómenos de evolução intra-hospedeiro durante o processo de infecção (Fig. 4).

A análise Bayesiana de cerca de centenas de isolados baseada em perfis de MIRU-VNTR sugere a presença de cinco populações ancestrais de *M. bovis*, denominadas de M1 a M5, que apresentam evidências de especificidade geográfica e algum tropismo por espécies de hospedeiros específicos (Fig. 4). A população M2 encontra-se significativamente associada à região de Castelo Branco, a M3 com Portalegre e a M5 com Beja, enquanto ao nível dos hospedeiros apenas se regista uma associação com significância estatística da população ancestral M4 com bovinos. Os isolados de *M. bovis* que circulam em regiões distintas apresentam uma maior diversidade genética, em relação à diversidade observada nos isolados de diferentes hospedeiros, o que reforça a ocorrência de transmissão interestespecífica numa mesma região.

No entanto, para clarificação de assinaturas moleculares específicas de cada região geográfica e de cada espécie hospedeira, recorre-se à sequenciação total de genomas, que possibilita uma elevada resolução na definição destas assinaturas e um esclarecimento inequívoco à escala individual do contexto epidemiológico. A aplicação de sequenciação total de genomas a um grupo de 42 isolados permitiu reconstruir parcialmente cadeias de transmissão, com sugestão de eventos recentes de disseminação (Fig. 5).

Mycobacterium caprae: um agente patogénico que merece atenção

Mycobacterium caprae é também agente etiológico de tuberculose, com especial in-

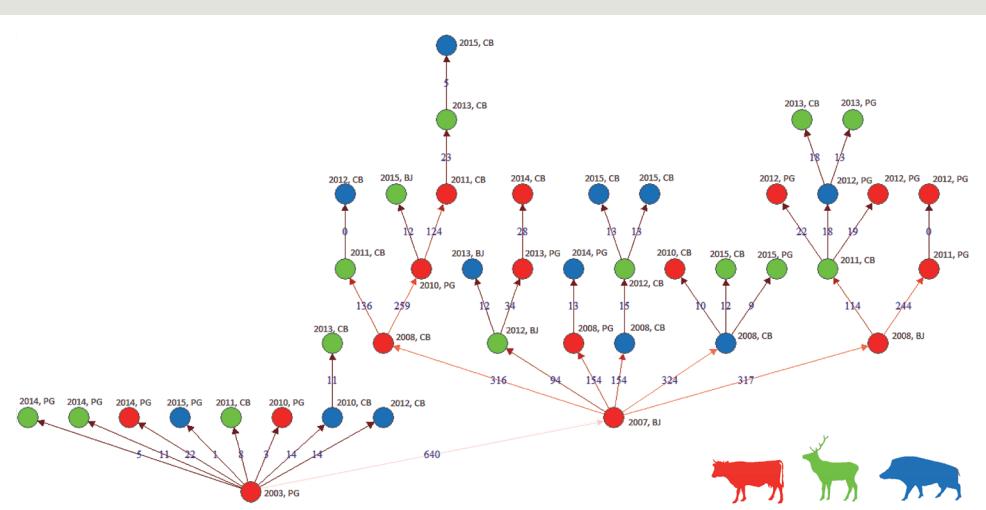


Figura 5 – Árvore de transmissão: reconstrução de cadeias de transmissão entre bovinos, veados e javalis, tendo como informação de base o ano de isolamento, espécie hospedeira e região geográfica de animais positivos à TB nos distritos de Beja (BJ), Castelo Branco (CB) e Portalegre (PG). As ligações estabelecidas têm por base o número de diferenças nucleotíidas (números indicados sobre as ligações) detetados nos genomas dos isolados

cidência em caprinos. Os ovinos, bovinos (e ungulados silvestres) são também suscetíveis à infecção, no entanto, para estes não está previsto um programa de controlo. Apesar da menor incidência, a circulação de *M. caprae*, que também pode infetar bovinos, causa limitações à erradicação.

A tuberculose causada por *M. caprae* apenas se encontra reportada em países europeus, sendo Portugal, Espanha, Reino Unido, Croácia, Áustria, Alemanha, Irlanda e Itália os países com surtos identificados. Esta particularidade epidemiológica em Portugal constitui um potencial nicho de investigação num agente patogénico que não pode ser negligenciado e cujo escasso conhecimento contrasta com o nível de informação disponível para *M. bovis*.

No período temporal entre 2003 e 2014, foram notificados, em Portugal continental e Açores, 55 casos de infecção por *M. caprae* em quatro espécies hospedeiras, nomeadamente caprinos, bovinos, ovinos e javali, sendo a maioria dos casos detetados em caprinos. A análise de similaridade genética, realizada após a aplicação das técnicas de genotipagem clássicas, agrupou os isolados em três complexos clonais (CC1-3) distintos, com uma distribuição geográfica díspar, encontrando-se o CC1 significativamente associado ao Alentejo, o CC2 à região Norte e o CC3 ao Alentejo e Açores (Fig. 6).

Próximos desafios da investigação

O Projeto COLOSSUS – ControlO de tubercuLOSe na interface bovinoS-faUna Silvestre com recurso a soluções inovadoras inspiradas na natureza (POCI-01-0145-FEDER-029783), com financiamento do FEDER e Orçamento de Estado, é liderado pelo INIAV em colaboração com a FCUL (BioISI) (PT), CIBIO (PT) e Universidade da Geórgia (EUA). Tem como objetivos reconstruir a história demográfica de *M. bovis*, inferir as cadeias de transmissão em ungulados domésticos e selvagens, hierarquizar o risco de infecção e identificar espécie(s) e área(s) de intervenção prioritárias consoante o cenário epidemiológico, reunindo informação relevante que informe políticas públicas e dê suporte à decisão de autoridades oficiais, proprietários e entidades gestoras.

No âmbito deste projeto, está em curso a sequenciação completa dos genomas de centenas de isolados de *M. bovis* obtidos em Portugal de diferentes contextos epidemiológicos ao longo dos últimos anos. Estão também a ser desenvolvidas ferramentas quantitativas que permitem ajustar

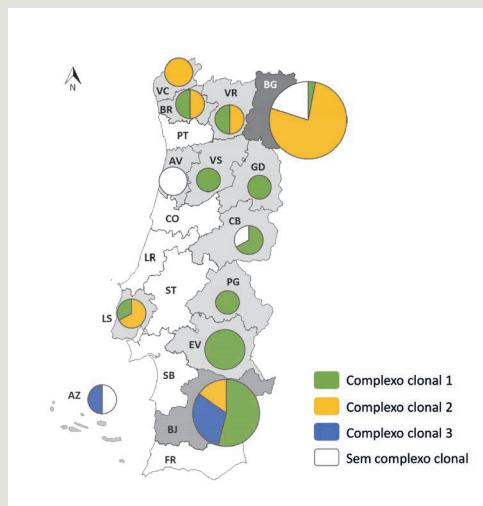


Figura 6 – Distribuição dos isolados de *M. caprae*, agrupados por complexo clonal e por região geográfica. A escala de cíntezos representa a intensidade de amostragem; as zonas a branco não foram amostradas

os recursos ao risco, nomeadamente uma aplicação computacional assente em modelos de transmissão multiescala, capaz de prever a eficácia de diferentes intervenções (por ex. remoção seletiva de animais, medidas de biossegurança, vacinação, alteração de manejo, etc.). Estes modelos serão baseados em simulações de surtos em bovinos, surtos em populações silvestres, e surtos nas diferentes interfaces, com incorporação de metadados e filodinâmica. A análise comparativa de genomas também permitirá elucidar aspectos da variação antigénica de *M. bovis*, o que poderá ter implicações no diagnóstico em vida e contribuir para o desenvolvimento de uma estratégia eficaz que proteja os animais da infecção. No âmbito do projeto COLOSSUS, está ainda a decorrer o desenvolvimento de uma nova abordagem que integra cito-metria de fluxo, hibridação *in situ* e amplificação de genomas completos, tendo em vista a quantificação da viabilidade celular e caracterização molecular de *M. bovis* ambiental, através da análise de matrizes ambientais (solo, água, lama, etc.) recolhidas em áreas onde comprovadamente este agente circula. A visão mecanística desta componente indireta da infecção, em paralelo com a componente clínica, será valiosa para entender o seu peso na manutenção de *M. bovis* no ecossistema e para decidir sobre as melhores opções de controlo consoante o cenário epidemiológico de cada área afetada. ☀

Bibliografia consultada

- Cunha, M.V.; Matos, F.; Canto, A.; Albuquerque, T.; Alberto, J.R.; Aranha, J.M.; Vieira-Pinto, M.; Botelho, A. (2012). Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: a molecular epidemiology perspective. *Res Vet Sci*, **92**(2):225-235.
- Cunha, M.V.; Monteiro, M.; Carvalho, P.; Mendonça, P.; Albuquerque, T.; Botelho, A (2011). Multihost tuberculosis: insights from the Portuguese control program. *Vet Med Int*, **2011**:795165.
- DGAV (2011). *Plano de Controlo e Erradicação de Tuberculose em Caça Maior*.
- DGAV (2011). *Programa de erradicação da tuberculose bovina*.
- DGAV (2017). *Relatório Técnico de sanidade animal – Tuberculose Bovina*.
- Duarte, E.L.; Domingos, M.; Amado, A.; Botelho, A. (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet. Microbiol.*, **130**(3-4):415-21.
- OIE (2018). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018*. OIE.
- Palmer, M.V.; Thacker, T.C.; Waters, W.R.; Gortázar, C.; Corner, L.A.L. (2012). *Mycobacterium bovis*: A model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans. *Vet Med Int*, 1-17.
- Rodriguez-Campos, S.; Schürch, A.C.; Dale, J.; Lohan, A.J.; Cunha, M.V.; Botelho, A.; De Cruz, K.; Boschioli, M.L.; Boniotti, M.B.; Pacciarini, M.; Garcia-Pelayo, M.C.; Romero, B.; de Juan, L.; Domínguez, L.; Gordon, S.V.; van Soolingen, D.; Loftus, B.; Berg, S.; Hewinson, R.G.; Aranaz, A.; Smith, N.H. (2012). European 2 – a clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. *Infect Genet Evol*, Jun, **12**(4):866-72.
- Santos, N.; Almeida, V.; Gortázar, C.; Correia-Neves, M. (2015). Patterns of *Mycobacterium tuberculosis*-complex excretion and characterization of super-shedders in naturally-infected wild boar and red deer. *Veterinary Research*, **46**:129.
- Santos, N.; Nunes, T.; Fonseca, C.; Vieira-Pinto, M.; Almeida, V.; Gortázar, C.; Correia-Neves, M. (2018). Spatial analysis of wildlife tuberculosis based on a serologic survey using dried blood spots, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, **24**(12):2169-2175.
- Santos, N.; Santos, C.; Valente, T.; Gortázar, C.; Almeida, V.; Correia-Neves, M. (2015). Widespread Environmental Contamination with *Mycobacterium tuberculosis* Complex Revealed by a Molecular Detection Protocol. *PLoS One*, **10**(11): e0142079.