DANÚBIA DE SOUZA FONTANA

**Caracterização genética de isolados de *Mycobacterium bovis* no
Estado de Mato Grosso, Brasil**

São Paulo

2018

DANÚBIA DE SOUZA FONTANA

**Caracterização genética de isolados de *Mycobacterium bovis* no
Estado de Mato Grosso, Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3658
FMVZ

Fontana, Danúbia de Souza
Caracterização genética de isolados de *Mycobacterium bovis* no Estado de Mato Grosso, Brasil / Danúbia de Souza Fontana. – 2018.
55 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Tuberculose bovina. 2. Epidemiologia molecular. 3. MIRU-VNTR. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização genética de isolados de *Mycobacterium bovis* no Estado de Mato Grosso, Brasil.", protocolada sob o CEUA nº 3467300115, sob a responsabilidade de **José Soares Ferreira Neto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 08/04/2015.

We certify that the proposal "Genetic characterization of *Mycobacterium bovis* isolates in the Brazil Mato Grosso State.", utilizing 2500 Bovines (2500 males), protocol number CEUA 3467300115, under the responsibility of **José Soares Ferreira Neto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/08/2015.

São Paulo, 16 de maio de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FONTANA, Danúbia de Souza

Título: **Caracterização genética de isolados de *Mycobacterium bovis* no Estado de Mato Grosso, Brasil.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: 28/06/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: _____

Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias

Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: _____

Dra. Rísia Lopes Negreiros

Instituição: INDEA/MT

Julgamento: _____

Prof. Dr. Eduardo Eustáquio de Souza Figueiredo

Instituição: UFMT

Julgamento: _____

Dra. Valéria Stacchini Ferreira Homem

Instituição: MAPA

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana Luci e Márcio Fontana, pela dedicação, amor incondicional, respeito, persistência e paciência. Minha eterna gratidão por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a Deus que diante de inúmeras possibilidades me proporcionou bons momentos de sabedoria, amizades, orientações, descobertas, vivência, crescimento pessoal e desafios.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor José Soares Ferreira Neto, pela grande oportunidade de fazer o Doutorado em um programa de Pós-Graduação considerado de excelência na área de medicina veterinária. Pela orientação, paciência, disponibilidade, ensinamentos, exemplo de profissional, apoio, experiência. Meu eterno agradecimento.

Agradeço a todos os técnicos de laboratórios, secretários e docentes do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses pelo enorme conhecimento e disposição em repassá-lo, exemplos de grandes profissionais que contribuem significativamente para a pesquisa no Brasil.

Agradeço enormemente a todos os colegas do laboratório de zoonoses bacterianas, especialmente ao Prof. Dr. Marcos Bryan, à Gisele, Osvaldo, Nícolas, Cássia, Juliana, Israel e Eleine pelos ensinamentos, ajuda nas análises, disposição, amizade, empatia, apoio e ao Antônio, pela enorme ajuda nas análises, paciência, orientação e organização. Meu eterno agradecimento.

Agradeço aos colegas do INDEA/MT, especialmente à Jociane, João Marcelo, Daniella Soares, Marcelo Barros, Isabela Lopes, Daniella Schettino, Rísia, Souto, Anna Karina, Amanda, Maria Fernanda, Luana, Teresa, Denise e demais colegas médicos veterinários e funcionários das unidades locais que não mediram esforços em contribuir com o trabalho e pelo incentivo em fazer mais uma qualificação.

Agradeço aos integrantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA-MT), em especial à Janice Barddal, que contribuiu com valioso apoio na realização deste trabalho, pela sua dedicação, conhecimento e auxílio, envidando esforços para que o trabalho fosse realizado. E aos médicos veterinários e outros funcionários que participaram e contribuíram com a coleta das amostras. Meu eterno agradecimento.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente na elaboração, execução e finalização deste trabalho.

RESUMO

FONTANA, D.S. **Caracterização genética de isolados de *Mycobacterium bovis* no Estado de Mato Grosso, Brasil.** [Genetic characterization of *Mycobacterium bovis* isolates in the State of Mato Grosso, Brazil]. 2018. 55 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Técnicas de genotipificação do *Mycobacterium bovis* baseadas na amplificação do DNA via PCR como MIRU-VNTR constituem importantes ferramentas na investigação epidemiológica da tuberculose bovina (TB) em áreas de baixa prevalência, como no Estado de Mato Grosso. Isto posto e diante de limitadas informações a respeito dos genótipos grassantes no Estado, foi realizado monitoramento nas linhas de inspeção sanitária pós-abate em 35 matadouros-frigoríficos sob inspeção oficial para detectar lesões granulomatosas sugestivas de TB e proceder a coleta e análise de amostras. Foram processadas e analisadas 167 amostras mediante isolamento bacteriano e técnicas moleculares. Através do método de genotipagem MIRU-VNTR, 49 isolados de *M. bovis* foram analisados aplicando-se 24 pares de *primers* diferentes. Desses, 20 marcadores de VNTR mostraram polimorfismo genético. O *locus* QUB26 apresentou alto poder discriminatório ($h=0,66$) enquanto ETRC (0,54), Mtub21 (0,5), QUB11b (0,33) e Mtub34 (0,31) mostraram moderada diversidade alélica. Os outros 15 *loci* (Mtub 04, 29 e 39; MIRU 04, 16, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40; ETR A; ETR B; QUB 4156) revelaram baixo poder discriminatório ($h=0,02 - 0,27$). Quatro *loci* (MIRU 2, 10 e 20; Mtub30) não apresentaram diversidade alélica. Foram observados 28 perfis genéticos (V1-V28) nos isolados de *M. bovis* obtidos em 35 propriedades rurais. Dentre essas, 30 (85,71%) apresentaram somente 1 tipo de perfil genético. Apenas 19 amostras (38,77%) apresentaram perfil MIRU-VNTR único revelando a existência de isolados com o mesmo perfil MIRU-VNTR entre diferentes regiões geográficas no Estado. O isolamento, seguido da identificação molecular e discriminação genotípica por MIRU-VNTR em isolados de *M. bovis* constituíram fontes de relevantes informações auxiliares no desenvolvimento de estratégias de erradicação da TB na região de estudo.

Palavras-chave: Tuberculose bovina. Epidemiologia molecular. MIRU-VNTR.

ABSTRACT

FONTANA, D.S. **Genetic characterization of *Mycobacterium bovis* isolates in the State of Mato Grosso, Brazil.** [Caracterização genética de isolados de *Mycobacterium bovis* no Estado de Mato Grosso, Brasil]. 2018. 55 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Mycobacterium bovis genotyping techniques based on PCR amplification as MIRU-VNTR are important tools in the epidemiological investigation of bovine tuberculosis in areas of low prevalence, such as in the state of Mato Grosso. Based on limited information about the genotypes in state, post-slaughter sanitary inspection lines were monitored in 35 slaughterhouses under official inspection to detect granulomatous lesions suggestive of TB and to collect and analyze samples. 167 Samples were processed and analyzed by bacterial isolation and molecular techniques. Through the MIRU-VNTR genotyping method, 49 *M. bovis* isolates were analyzed by applying 24 different primer pairs. Of these, 20 VNTR markers showed genetic polymorphism. The QUB26 locus presented high discriminatory power ($h = 0.66$) while ETRC (0.54), Mtub21 (0.5), QUB11b (0.33) and Mtub34 (0.31) showed moderate allelic diversity. The other 15 loci (Mtub 04, 29 e 39; MIRU 04, 16, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40; ETR A; ETR B; QUB 4156) showed low discriminatory power ($h = 0.02 - 0.27$). Four loci (MIRU2, MIRU10, MIRU20 and Mtub30) did not present allelic diversity. Twenty-eight genotypes (V1-V28) were observed in the *M. bovis* isolates obtained from 35 rural properties. Among these, 30 (85.71%) presented only 1 genotype type. Only 19 samples (38.77%) presented a single MIRU-VNTR profile revealing the existence of isolates with the same MIRU-VNTR profile among different geographic regions in the State. Isolation, followed by molecular identification and genotypic discrimination by MIRU-VNTR in *M. bovis* isolates were sources of relevant auxiliary information in the development of strategies to eradicate TB in the study region.

Keywords: Bovine tuberculosis. Molecular epidemiology. MIRU-VNTR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Distribuição geográfica dos matadouros-frigoríficos participantes do sistema de coleta de amostras.17
- Figura 2 - Distribuição geográfica dos perfis genéticos de isolados de *M. bovis*..... 31
- Figura 3 - Dendograma da distribuição de 49 isolados de *M. bovis* procedentes de 35 propriedades em 26 municípios do Estado de Mato Grosso. As cores representam os municípios de origem dos animais. N° de ordem é um número sequencial de 1 a 49. ID é a identificação de cada amostra seguida do número de identificação de cada propriedade.....34
- Figura 4- Distribuição geográfica de 9 *clusters* identificados e distribuídos em 18 municípios do Estado de Mato Grosso35
- Figura 5 - *Minimum spanning tree* (MST) de 49 isolados de *M. bovis* com 28 tipos de MIRU-VNTR obtidos com a análise de 24 *loci*. As cores nos círculos indicam os municípios que originaram as amostras analisadas. Entre parêntese, o número da propriedade de origem ao lado do index de designação. Círculos com mais de uma cor indicam isolados com um mesmo perfil genotípico, mas procedentes de municípios diferentes. As linhas (contínua forte, fraca e tracejada) indicam a diferença de 1 a 3 *loci* entre os genótipos, respectivamente.37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação, posição do <i>locus</i> e sequência dos 24 <i>primers</i> utilizados na técnica MIRU-VNTR.....	22
Tabela 2 - Frequência de isolamento de <i>M. bovis</i> em amostras de lesões obtidas a partir de carcaças bovinas em matadouros-frigoríficos sob SIF e SISE no Estado de Mato Grosso.....	25
Tabela 3 - Análise de MIRU-VNTR em isolados de <i>M. bovis</i> de lesões granulomatosas obtidas a partir de carcaças bovinas em matadouros-frigoríficos sob SIF e SISE no Estado de Mato Grosso.....	26
Tabela 4 - Distribuição alélica de cada <i>locus</i> VNTR nos 49 isolados de <i>M. bovis</i> em amostras obtidas a partir de carcaças em matadouros-frigoríficos sob SIF e SISE no Estado de Mato Grosso.....	28
Tabela 5 - Número de diferentes perfis e diversidade genotípica determinados pela combinação de diferentes <i>loci</i> VNTR.	29
Tabela 6 - Perfil VNTR dos isolados de <i>M. bovis</i> em amostras obtidas a partir de carcaças em matadouros-frigoríficos sob SIF e SISE no Estado de Mato Grosso, de acordo com a propriedade de origem dos bovinos.	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 AMOSTRAS	17
3.2 FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES REALIZADAS	18
3.3 ISOLAMENTO BACTERIOLÓGICO	19
3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	19
3.4.1 Extração e purificação de DNA	19
3.4.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	20
3.4.2.1 TB PCR Multiplex	20
3.4.2.2 RD PCR Multiplex	20
3.4.3 Eletroforese	21
3.5 DISCRIMINAÇÃO MOLECULAR	21
3.5.1 MIRU-VNTR	21
3.6 TRATAMENTO DOS DADOS	24
3.6.1 Cálculo da diversidade alélica	24
3.6.2 Poder discriminatório dos isolados de <i>M. bovis</i>	24
3.6.3 Definição de <i>cluster</i>	24
3.6.4 Caracterização dos complexos clonais	25
4 RESULTADOS	25
4.1 ANÁLISE DOS <i>LOC</i> /DO MIRU-VNTR EM <i>M. BOVIS</i> ISOLADOS	26
4.2 DIVERSIDADE ALÉLICA E GENOTÍPICA	27
4.3 ANÁLISE DE <i>CLUSTER</i>	33
4.4 CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS CLONAIIS	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	54

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (TB) é uma doença granulomatosa crônica, de caráter infeccioso, que tem como agente causal o *Mycobacterium bovis*, membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. O *M. bovis* tem uma ampla variedade de hospedeiros, podendo infectar diversas espécies de mamíferos silvestres e domésticos, como bovinos, suínos, primatas e carnívoros (PARREIRAS, 2003).

A TB encontra-se disseminada por todo o mundo e sua prevalência varia de acordo com a realidade de cada país (MICHEL et al. 2010). Possui alta prevalência nos países em desenvolvimento, porém baixa prevalência em países desenvolvidos devido a implantação e consolidação de programas de controle e erradicação da doença. Esses programas visam o saneamento do rebanho através da identificação de animais infectados e sacrifício de animais reatores à tuberculina, a implantação de um sistema de vigilância epidemiológica a partir do monitoramento de carcaças de animais com lesões presuntivas de TB em matadouros-frigoríficos com serviços oficiais e pela pasteurização de leite para consumo (SALAZAR, 2005; KANTOR; RITACCO, 2006; DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Na União Europeia, países são classificados oficialmente livres de TB se houver manutenção da prevalência de rebanho abaixo de 0,1% por um período mínimo de 6 anos consecutivos (GARCIA-SAENZ et al., 2015). Em países considerados não livres como a Espanha, a vigilância da doença baseia-se em testes tuberculínicos periódicos no rebanho, remoção dos animais reatores, testes antes da movimentação dos animais e a inspeção de carnes em matadouros-frigoríficos (GARCIA-SAENZ et al., 2015).

No Brasil, com o objetivo de baixar a prevalência e a incidência da brucelose e tuberculose visando a erradicação, foi estabelecido o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) e a classificação das Unidades da Federação de acordo com o grau de risco para as doenças em questão, assim como a definição de procedimentos de defesa sanitária animal a serem adotados de acordo com a classificação (BRASIL, 2017).

Frente à escassez de dados até a criação do PNCEBT, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) passou a fomentar a realização de estudos junto às Unidades Federativas com o objetivo de caracterizar a situação

epidemiológica da tuberculose e brucelose no Brasil. Treze Unidades Federativas no Brasil (Distrito Federal, Espírito Santo, Bahia, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pernambuco, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Goiás, Santa Catarina, Rondônia e Paraná) que representam 75% do rebanho brasileiro, já realizaram o estudo da situação epidemiológica da TB entre os anos de 2003 e 2015 e demonstraram heterogeneidade entre e dentro dos Estados, apresentando uma variação dos índices de prevalências de TB em rebanhos de 0,36% no Distrito Federal a 9% em São Paulo, e em animais, variando de 0,035% em Mato Grosso do Sul a 1,3% em São Paulo (ANZAI et al., 2016; BAHIENSE et al., 2016; BELCHIOR et al., 2016; DIAS et al., 2016; FERREIRA NETO et al., 2016; GUEDES et al., 2016; LIMA et al., 2016; NÉSPOLI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016; ROCHA et al., 2016; SILVA et al., 2016; VELOSO et al., 2016; VENDRAME et al., 2016). Além disso, verificou-se que os focos de TB estão associados às propriedades de leite com alta produção, providas de algum grau de tecnificação, e à venda e introdução de animais, aparentemente sem a realização prévia de testes tuberculínicos (FERREIRA NETO et al., 2016).

Em Mato Grosso, Néspoli et al. (2016) observaram uma baixa prevalência de TB tanto em rebanhos (1,3%) quanto em animais (0,12%). Destarte, foi instituído o Plano de Vigilância para Erradicação da TB no Estado em estudo, que se baseia na detecção de carcaças bovinas e bubalinas com lesões tuberculosas em matadouros-frigoríficos, confirmação da etiologia tuberculosa através de técnicas de diagnóstico e subsequente rastreamento e saneamento das propriedades foco (MATO GROSSO, 2014). O intuito é executar essa atividade em estabelecimentos de abate de bovinos e bubalinos sob inspeção Federal, Estadual e Municipal do Estado, com destaque para estabelecimentos com os dois últimos tipos de inspeção oficial, nos quais a expectativa de prevalência da doença é maior, haja vista o abate essencialmente de animais de descarte oriundos de pequenas propriedades com aptidão leiteira ou mista (GRISI-FILHO et al., 2011; NÉSPOLI et al., 2016).

O diagnóstico direto da TB é considerado um elemento central no referido sistema de controle, visto que o rastreamento e saneamento da propriedade é desencadeado apenas após a confirmação bacteriológica do foco, não havendo, portanto, falsos positivos. Nos últimos anos, o desenvolvimento e o emprego de novos métodos no diagnóstico da TB utilizando-se de técnicas moleculares, proporcionaram

diversos avanços para o diagnóstico dessa doença e têm contribuído para a identificação e tipagem de *M. bovis* em tempo relativamente curto.

Os primeiros estudos sobre a filogenia dos membros do complexo *M. tuberculosis* foram realizados com base nos resultados obtidos pela técnica IS6110-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que analisa o polimorfismo da inserção da sequência 6110 (IS6110), uma típica sequência repetitiva do complexo *M. tuberculosis*. Porém, a técnica apresenta algumas limitações como seu baixo poder discriminatório para isolados de *M. bovis*, que apresentam poucas cópias IS6110 em seu genoma, além disso não identifica algumas linhagens genéticas, ocasionando o uso de uma tipagem secundária baseada em outro marcador genético (KREMER et al., 2005).

As sequências repetitivas organizadas em *tandem* no DNA (VNTR) de unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (MIRU) surgiram como valiosos marcadores para genotipagem de várias espécies bacterianas, especialmente para patógenos geneticamente homogêneos, como *Bacillus anthracis* (KEIM et al., 1999), *Yersinia pestis* (LE FLECHE et al., 2001) e os membros do complexo *M. tuberculosis*.

A genotipagem MIRU-VNTR baseia-se na amplificação por PCR utilizando *primers* específicos para regiões flangeadoras do VNTR e na determinação dos tamanhos dos produtos da PCR, após migração eletroforética. Como o comprimento das unidades de repetição é conhecido, esses tamanhos refletem os números das cópias VNTR amplificadas. O resultado é um código numérico, correspondendo ao número de repetição em cada *locus* VNTR (FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998; MAZARS et al., 2001). O polimorfismo nos *loci* do tipo repetição em tandem pode ocorrer como uma variação no número de unidades repetidas ou como uma mudança de nucleotídeos, gerando em ambos os casos uma variação alélica (VAN BELKUM et al., 1998).

É uma técnica considerada rápida, podendo ser executada em colônias de micobactérias sem extensivas purificações do DNA, reprodutível, sensível, apropriada para todos os isolados do complexo *M. tuberculosis* incluindo amostras que apresentam poucas cópias de *IS6110*, além de permitir comparações de resultados entre laboratórios (MAZARS et al., 2001).

Técnicas de genotipagem baseadas na amplificação do DNA via PCR, como o MIRU-VNTR consistem em ferramentas padrão para o controle e erradicação de doenças, por isso têm sido utilizadas na identificação e confirmação de surtos de TB

e a relação entre eles, na inferência dos fatores de risco para a transmissão e no rastreamento e distribuição geográfica de cepas (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al., 2003; ZUMARRAGA et al., 2005).

A aplicação da genotipagem também contribui no esclarecimento da estrutura clonal do complexo *M. tuberculosis*, que se constitui de distintas linhagens filogenéticas caracterizadas pelas diferenças em suas distribuições geográficas, imunogenicidade, virulência e associações com tuberculoses multidroga-resistentes (SUPPLY et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil genético de isolados de *M. bovis*, pela técnica molecular de MIRU-VNTR, provenientes de amostras de lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose bovina coletadas em carcaças bovinas nos matadouros-frigoríficos de Mato Grosso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar espécies do gênero *Mycobacterium* através de técnica molecular;
- Realizar análise descritiva do diagnóstico macroscópico realizado pelos inspetores de carne nas linhas de inspeção dos matadouros-frigoríficos sob SIF (Serviço de Inspeção Federal) e SISE (Serviço de Inspeção Estadual);
- Comparar os resultados obtidos pela técnica de MIRU-VNTR e avaliar seu poder discriminatório utilizando os 24 *loci*;
- Avaliar a presença de grupos genéticos predominantes;
- Verificar a associação dos perfis genéticos obtidos dos isolados através da análise de *cluster* e caracterização dos complexos clonais;
- Obter maior conhecimento sobre a epidemiologia da TB na região de estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

No período de janeiro de 2015 a dezembro de 2017 foi realizado monitoramento nas linhas de inspeção sanitária pós-abate em todos os matadouros-frigoríficos registrados no Serviço de Inspeção Oficial e em atividade no Estado de Mato Grosso, sendo 26 matadouros-frigoríficos registrados junto ao SIF e 9 sob SISE em 22 municípios do Estado de Mato Grosso (Figura 1), para identificar carcaças apresentando lesões granulomatosas sugestivas de TB e proceder a coleta de amostras.

Figura 1- Distribuição geográfica dos matadouros-frigoríficos participantes do sistema de coleta de amostras.

Fonte: (INDEA, 2018; MAPA, 2018)

As amostras de lesões foram armazenadas individualmente e mantidas à temperatura de congelamento para posterior envio juntamente com respectiva guia acompanhatória (Anexo), ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LZB-FMVZ-USP). Dados relativos ao município e propriedade de origem dos animais acometidos por TB foram obtidos na guia de trânsito animal fornecida na guia acompanhatória da amostra. Da coleta ao processamento não foi excedido o prazo de dois meses.

3.2 FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES REALIZADAS

Para melhor compreensão da sequência de procedimentos realizados, segue o fluxograma.

3.3 ISOLAMENTO BACTERIOLÓGICO

No LZB-FMVZ-USP as amostras foram processadas individualmente. Alíquota de 1 mL de homogeneizado das lesões, resultante da maceração de 1 g de tecido diluído em 5 mL de solução salina estéril, foi submetida ao processo de descontaminação com cloreto de 1-Hexadecilpiridínio (HPC) (CORNER; TRAJSTAMAN, 1988). O método consiste na adição de HPC a 1,5% à amostra (proporção 1:1), seguido de repouso à temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugação a 3.000 R.P.M. durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, sendo o sedimento ressuspensão em 1 mL de solução salina estéril.

Em duplicata, foram semeados 100 µL das suspensões homogeneizadas em tubos contendo o meio Stonebrink-Lesslie e o Löwenstein-Jensen (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985), incubados a 37°C por até 90 dias e observados semanalmente. Colônias de morfologia e características compatíveis com micobactérias foram coradas pelo método Ziehl-Neelsen (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972) para pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Os isolados BAAR foram submetidos à identificação molecular de micobactérias.

Amostras processadas pelo método HPC que não resultaram em isolamento de BAAR foram submetidas à nova tentativa de isolamento pelo método Petroff (AMBROSIO et al. 2008).

3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.4.1 Extração e purificação de DNA

O DNA genômico usado nas análises de PCR foi extraído por meio de termólise (MAZARS et al., 2001), obtido por ressuspensão de colônias de micobactérias em 200µl de Tris-HCl 10 mM / EDTA 1 mM (pH 7,0) seguido de incubação a 95 °C durante 45 min. Após centrifugação da suspensão a 12.000g por 7 minutos, o sobrenadante contendo o DNA foi colhido e armazenado a -20 °C até a utilização posterior.

3.4.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

3.4.2.1 TB PCR Multiplex

O protocolo descrito por Wilton e Cousins (1992) foi utilizado para identificar o gênero *Mycobacterium* e diferenciar as espécies *M. avium* e *M. intracellulare* do complexo *M. tuberculosis*.

Foram realizadas reações de 50 µL contendo: tampão de reação, dNTP (1,25 mM cada), 10 pmoles de cada *primer*, MYCGEN-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), MYCGEN-R (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3'), MYCAV-R (5'-ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3'), MYCINT-F (5'-CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3'), TB1-F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') e TB1-R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3'), 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM MgCl₂, 1,25 U Taq DNA polimerase e 2,5 µL da amostra de DNA. O termociclador foi programado para um ciclo de desnaturação a 94 °C por 10 minutos, 35 vezes do ciclo de amplificação, 94 °C por 30 segundos, 61 °C por 2 minutos e 72 °C por 3 minutos, seguido de um ciclo final a 72 °C por 10 minutos. Foram utilizados como controles positivos: cepa AN5 de *M. bovis* para o complexo *M. tuberculosis*, cepa ATCC 582 para o complexo *M. avium* e cepa ATCC13950 para o *M. intracellulare*.

3.4.2.2 RD PCR Multiplex

Amostras identificadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (CMT) foram submetidas à técnica de RD PCR Multiplex para diferenciar *M. bovis* dos outros membros do complexo *M. tuberculosis*, conforme protocolo descrito por Warren et al. (2006). Foram realizadas reações de 25 µL contendo: tampão de reação, dNTP (1,25 mM cada), 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, iniciadores RD1-1 (5'-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3'), RD1-2 (5'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-3'), RD1-3 (5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3'), RD4-1 (5'-ATGTGCGAGCTGAGCGATG-3'), RD4-2 (5'-TGTACTATGCTGACCCATGCG-3') e RD4-3 (5'-AAAGGAGCACCATCGTCCAC-3'), 1,25 U Taq DNA polimerase e 5 µL da amostra de DNA em estudo. O ciclo da PCR empregado foi: desnaturação a 95 °C por 15 minutos,

35 vezes do ciclo de amplificação, 94 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, seguido de um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. A cepa AN5 para *M. bovis* e a cepa H37Rv para *M. tuberculosis* foram utilizadas como controles positivos.

3.4.3 Eletroforese

Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), usando-se tampão de corrida TBE 0,5X (1 M Tris-acetato, 0,9 M ácido bórico e 0,01 M EDTA). O gel foi corado com SYBR Safe (Invitrogen™, NY, USA), conforme instruções do fabricante e visualizados em transiluminador ultravioleta.

Os fragmentos foram identificados com base na utilização dos marcadores de peso molecular 50 bp e 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™, NY, USA).

3.5 DISCRIMINAÇÃO MOLECULAR

Os isolados identificados como *M. bovis* foram submetidos à técnica de MIRU-VNTR.

3.5.1 MIRU-VNTR

A tipagem molecular de *M. bovis* foi realizada pela técnica de MIRU-VNTR para detectar o número de repetição dos *loci* pela verificação do tamanho dos produtos amplificados por meio da PCR, utilizando 24 pares de *primers* diferentes (Tabela 1) (SUPPLY et al., 2005).

Tabela 1 - Identificação, posição do *locus* e sequência dos 24 *primers* utilizados na técnica MIRU-VNTR.

Identificação	Locus	Sequência (5'-3')
MIRU 2	154	TGGA CTTCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
MIRU 4	580	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC
MIRU 10	960	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU 16	1644	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU 20	2059	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MIRU 23	2531	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC
MIRU 24	2687	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU 26	2996	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG
MIRU 27	3007	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU 31	3192	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU 39	4348	CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU 40	802	GGGTTGCTGGATGACAACTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
VNTR-42	424	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
VNTR-43	577	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
VNTR-52	3690	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
VNTR-53	4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT
VNTR-46	2347	GCCAGCCGCGGTGCATAAACCT AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
VNTR-47	2401	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
VNTR-48	2461	ATGGCCACCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
VNTR-49	3171	GGTGCGACCTGCTCCAGATAA GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC
VNTR-1955	1955	AGATCCCAGTTGTGTCGTC

		CAACATCGCCTGGTTCTGTA
ETR A	2165	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT
		CGAAGCCTGGGGTGCCCGCATTT
QUB-11b	2163b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG
		CGAAGTGAATGGTGGCAT
QUB-26	4052	AACGCTCAGCTGTCGGAT
		CGGCCGTGCCGCCAGGTCCTTCCCGAT

Fonte: (SUPPLY et al., 2005).

Foram realizadas reações com volume final de 18 µL contendo 6 µL de *Go Taq Green Master Mix*, 0,3 pmol de cada *primer*, 100 ng de DNA e água livre de nucleases. Amostras de *M. tuberculosis* cepa H37Rv e água livre de nucleases foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

Ciclo da PCR empregada: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos seguida de 40 vezes o ciclo de amplificação a 94 °C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 72 °C por 90 segundos e um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

O produto amplificado foi revelado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado SYBR Safe (Invitrogen™, NY, USA). Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™) foi utilizado. A visualização e a documentação foram feitas pelo software GeneSys® (Syngene).

Após foto documentação, a quantidade de alelos por *locus* de cada amostra foi determinada de acordo com a tabela publicada por Supply et al. (2005), que relaciona a quantidade de pares de base do fragmento obtido com a quantidade de cópias de cada alelo. Cada amostra recebeu um código numérico para descrever seu perfil genético conforme a quantidade de alelos. Em seguida, os códigos foram exportados e analisados pelo programa *BioNumerics* software 7.6.2 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, BE) e pelo aplicativo *MIRU-VNTRplus* (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>) para caracterização de complexos clonais e análise de *Cluster*.

O teste foi considerado válido se o resultado do controle positivo correspondeu ao obtido por Supply et al. (2005). Foi utilizado o ponto de corte de 0,17 (padrão 22 do aplicativo), que corresponde a uma tolerância de até quatro *loci* de diferença, para analisar a similaridade entre as cepas em estudo.

O perfil genético dos isolados em estudo foi utilizado na geração do dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

3.6 TRATAMENTO DOS DADOS

3.6.1 Cálculo da diversidade alélica

O cálculo da diversidade alélica genética de cada *locus* (h) de MIRU-VNTR foi realizado conforme preconizado por Selander et al. (1986), segundo a fórmula:

$$h = (1 - \sum x_i^2) / (n/n - 1)$$

onde x_i é a frequência do alelo i no *locus* e n o número de isolados.

A diversidade alélica (h) é um bom índice indireto de heterogeneidade/polimorfismo das amostras e índice de poder discriminatório fornecido pelos *loci* em estudo (SELANDER et al., 1986). Segundo Sola e colaboradores (2003), com base nesse índice, a amostra é considerada altamente discriminatória/polimórfica se $h > 0,6$; moderadamente discriminatória se $0,3 \geq h \leq 0,6$ e fracamente discriminatória se $h < 0,3$.

3.6.2 Poder discriminatório dos isolados de *M. bovis*

O cálculo do poder discriminatório (D) do MIRU-VNTR foi realizado conforme preconizado por Hunter-Gaston (1988), segundo a fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

sendo N o número de isolados (amostras) em uma população, s o número total de tipos descritos e n_j o número de amostras pertencentes ao tipo j .

O index de discriminação foi calculado para determinar o poder discriminatório geral do MIRU-VNTR por meio da ferramenta de site (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power).

3.6.3 Definição de *cluster*

Os casos de TB foram definidos como *cluster* quando 2 ou mais isolados de *M. bovis* de diferentes amostras analisadas apresentaram idêntico perfil genético. Cepas que não apresentaram correspondência com quaisquer outros isolados no período de estudo foram classificadas como genótipos individuais (RODWELL et al. 2012).

3.6.4 Caracterização dos complexos clonais

A semelhança genética das cepas nos casos agrupados foi posteriormente analisada pelo cálculo da variação da frequência de *locus* variantes usando o modelo *Minimum spanning tree* (MST) da ferramenta de bioinformática *BioNumerics* software 7.6.2 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, BE) e pelo aplicativo MIRU-VNTR_{plus} (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>).

4 RESULTADOS

Foram processadas e analisadas no LZB-FMVZ-USP, 167 amostras de lesões granulomatosas sugestivas de TB, obtidas a partir de 51,4% (18/35) dos matadouros-frigoríficos do Estado de Mato Grosso durante o período de janeiro de 2015 a dezembro de 2017, sendo 13 estabelecimentos sob SIF e 5 sob SISE. Os valores preditivos positivos do diagnóstico macroscópico feito pelos inspetores do SIF e SISE constam da tabela 2.

Tabela 2 - Frequência de isolamento de *M. bovis* em amostras de lesões obtidas a partir de carcaças bovinas em matadouros-frigoríficos sob SIF e SISE no Estado de Mato Grosso.

Serviço de Inspeção Oficial	SIF	SISE
Nº amostras coletadas e processadas	156	11
Nº de isolados de <i>M. bovis</i>	47	07
Valor preditivo positivo (%)	30,13	63,64

Do total de amostras processadas, 54 (32,33%) apresentaram crescimento de colônias com características compatíveis às de *M. bovis*, revelaram-se BAAR quando coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen e posteriormente, foram confirmadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* pela técnica TB PCR Multiplex e como *M. bovis* pela RD PCR Multiplex. Não houve contaminação ou perda de isolado nos procedimentos laboratoriais.

4.1 ANÁLISE DOS *LOC*I DO MIRU-VNTR EM *M. BOVIS* ISOLADOS

A análise de MIRU-VNTR foi realizada em 49 isolados de *M. bovis* através dos 24 pares de *primers* que incluíram MIRU (2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40), ETR (A, B, C), Mtub (04, 21, 29, 30, 34, 39) e QUB (11b, 26, 4156) (Tabela 3). Desses, apenas 4 marcadores (MIRU 2, 10, 20 e Mtub30) não mostraram polimorfismo genético. Não foi possível realizar a análise de MIRU-VNTR em 5 amostras do total de 54 isolados por não ocorrer marcação nas diversas execuções da técnica.

Tabela 3- Análise de MIRU-VNTR em isolados de *M. bovis* de lesões granulomatosas obtidas a partir de carcaças bovinas em matadouros-frigoríficos sob SIF e SISE no Estado de Mato Grosso.

Amostra	MIRU											ETR			Mtab						QUB			
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C	04	21	29	30	34*	39	11b	*26	4156
02/15	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	2	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
03/15	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
04/15	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
05/15	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	1
07/15	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	2	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
08/15	2	4	2	3	2	4	1	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	2	4	3	2	2	7	1
18/15	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
19/15	2	4	2	3	2	4	2	5	2	4	2	2	5	4	5	0	1	3	4	2	2	2	6	1
20/15	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	1	2	2	5	1
23/15	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	1
27/15	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	4	1
36/15	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	3	2	6	4	5	2	3	3	4	ND	2	6	ND	1
37/15	2	4	2	3	2	4	2	3	3	3	2	2	4	4	5	2	3	3	4	3	2	2	4	1
38/15	2	4	2	3	2	4	2	5	2	4	2	2	5	4	5	0	1	3	4	3	2	2	6	1
05/16	2	4	2	3	2	4	2	5	2	4	2	2	5	4	5	0	1	3	4	2	2	2	6	1
07/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	4	2	3	3	4	3	2	3	8	1
08/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	4	2	3	3	4	3	2	3	8	1
09/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	4	2	3	3	4	1	2	3	8	1
10/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	4	2	3	3	4	3	2	3	8	1
16/16	2	4	2	3	2	4	2	5	1	4	2	2	5	4	5	0	1	3	4	2	2	2	6	1
18/16	2	4	2	3	2	2	2	5	3	3	1	2	6	3	5	2	3	3	4	3	2	2	4	0
19/16	2	4	2	2	2	4	1	5	3	3	2	2	7	5	5	2	3	3	4	3	2	4	4	1
21/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	6	1
22/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	6	1
26/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	2	5	2	3	3	4	1	2	2	5	1
27/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	2	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
28/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	3	6	4	3	2	2	3	4	2	2	2	5	0
30/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	4	2	3	3	4	3	2	3	8	1
39/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	1

40/16	2	4	2	3	2	4	2	4	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
45/16	2	4	2	3	2	4	2	5	1	2	2	2	6	5	5	2	1	1	4	3	2	3	3	1
47/16	2	4	2	3	2	4	2	3	3	3	2	2	4	4	5	2	3	3	4	3	2	2	4	1
48/16	2	4	2	3	2	4	2	5	2	3	2	2	5	4	5	0	1	3	4	2	2	2	ND	1
49/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	1
69/16	2	4	2	4	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
71/16	2	4	2	3	2	4	2	6	3	3	2	2	6	2	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
74/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
75/16	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	3	3	4	3	2	2	5	1
15/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	4	2	3	3	4	3	2	3	8	1
16/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	4	2	2	3	4	3	2	2	5	1
17/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	4	2	3	3	4	3	2	3	8	1
18/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	1	6	4	5	2	3	3	4	3	3	2	5	1
19/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	1
20/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	1
23/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	0
24/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	0
25/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	5	1
29/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	3	2	2	3	4	3	2	2	5	0
30/17	2	4	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	6	4	5	2	3	3	4	3	2	2	4	1

*ND- Não determinado

4.2 DIVERSIDADE ALÉLICA E GENOTÍPICA

O número de alelos e a diversidade alélica (h) nos *loci* MIRU-VNTR são apresentados da tabela 4. A análise da diversidade alélica revelou diferença no poder discriminatório dos *loci* individuais, com h variando entre 0,00 a 0,66. O *locus* QUB26 apresentou alto poder discriminatório ($h=0,66$) enquanto ETRC (0,54), Mtub21 (0,5), QUB11b (0,33) e Mtub34 (0,31) mostraram moderada diversidade alélica. Os outros 15 *loci* (Mtub 04, MIRU 04, MIRU 40, MIRU 16, ETRA, Mtub 29, ETRB, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 26, MIRU 27, MIRU 31, Mtub 39, QUB 4156, MIRU 39) revelaram baixo poder discriminatório ($h=0,02 - 0,27$). Quatro *loci* (MIRU2, MIRU10, MIRU20 e Mtub30) não apresentaram diversidade alélica.

Tabela 4- Distribuição alélica de cada *locus* VNTR nos 49 isolados de *M. bovis* em amostras obtidas a partir de carcaças em matadouros-frigoríficos sob SIF e SISE no Estado de Mato Grosso.

<i>Loci</i>	Nº de cópias													Diversidade alélica (<i>h</i>)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MIRU2			49											0,00
MIRU4				2	47									0,06
MIRU10			49											0,00
MIRU16			1	47	1									0,06
MIRU20			49											0,00
MIRU23			1		48									0,02
MIRU24		2	47											0,06
MIRU26				2	1	45	1							0,14
MIRU27		2	4	43										0,21
MIRU31			1	44	4									0,17
MIRU39		1	47	1										0,06
MIRU40		1	47	1										0,06
ETRA					2	5	41	1						0,27
ETRB			5	1	41	2								0,27
ETRC				11	8	30								0,54
Mtub04	5		44											0,17
Mtub21		6	11	32										0,5
Mtub29		1	1	47										0,06
Mtub30					49									0,00
Mtub34*		3	5	40										0,31
Mtub39			48	1										0,02
QUB11B			39	8	1		1							0,33
QUB26*				1	6	26	6	1	7					0,66
QUB4156	5	44												0,17

*O *locus* Mtub34 não foi amplificado em 1 amostra e o QUB26 não amplificou em duas amostras.

O poder discriminatório da combinação dos *loci* VNTR foi avaliado e comparado (Tabela 5). O índice discriminatório geral do MIRU-VNTR utilizando os 24 *loci* foi 0,96 com 28 perfis genéticos diferentes. A combinação dos três VNTRs mais polimórficos (QUB26, ETRC, Mtub21) mostrou 10 diferentes perfis genéticos e uma alta diversidade genotípica ($h=0,83$). Ao adicionar QUB11b, Mtub34, ETRA aos 3 VNTRs já citados, 17 diferentes perfis genéticos foram identificados, com uma diversidade genotípica de 0,89.

Tabela 5 - Número de diferentes perfis e diversidade genotípica determinados pela combinação de diferentes *loci* VNTR.

Combinação de <i>loci</i> VNTR	Nº de <i>Loci</i>	Nº de perfis genéticos	Diversidade genotípica
MIRUs	12	16	0,62
ETRs	3	7	0,81
QUBs	3	10	0,74
QUB26, ETRC, Mtub21	3	10	0,83
QUB26, ETRC, Mtub21, QUB11b, Mtub34, ETRA	6	17	0,89
Todos VNTRs	24	28	0,96

O perfil VNTR dos 49 isolados de *M. bovis* foi analisado, sendo identificados 28 perfis genéticos (V1-V28) nas amostras de lesões granulomatosas coletadas em carcaças de bovinos oriundas de 35 propriedades rurais (Figura 2). Dentre essas propriedades, 30 (85,71%) apresentaram apenas 1 tipo de perfil genético (Tabela 6). Quatro perfis genéticos (V6, V8, V11, V22) coexistiram na propriedade 8 localizada no município de Sorriso, observados através da análise de 5 amostras coletadas em diferentes datas no matadouro-frigorífico. Dessas, duas apresentaram o perfil genético V6. Dois perfis genéticos diferentes foram obtidos em amostras coletadas de animais oriundos da propriedade 14, sendo três amostras com perfil V12 e uma V13. Perfis genéticos diferentes foram observados em duas amostras coletadas de cada uma das seguintes propriedades: 19 (V1 e V18) e 24 (V10 e V21). Na propriedade 29, das 3 amostras coletadas, duas apresentaram o perfil genético V12 e uma, o V26. Nas propriedades 18 e 22 foram coletadas 2 amostras em cada com os perfis genéticos V17 e V3, respectivamente. O perfil genético V3 foi observado em duas amostras coletadas na propriedade 31.

Os tipos de VNTR denominados V3 e V12 foram os mais frequentemente observados no estudo, seguido do V2 e V28. O primeiro foi identificado em 4 propriedades (11,43% do total de propriedades) localizadas nos municípios de Guiratinga, Nova Xavantina e Novo São Joaquim, enquanto o segundo foi observado em isolados oriundos de 3 propriedades distintas nos municípios de Arenópolis, Juína e Nova Marilândia que contabilizaram 12,24% do total de *M. bovis* isolados. O perfil genético V2 foi observado em 5 diferentes propriedades localizadas em Juscimeira, Nobres, Nova Xavantina, Rondonópolis e Santo Afonso. O V28 foi observado em

6,12% dos isolados de *M. bovis* procedentes de 3 propriedades nos municípios de Água Boa, Barra do Garças e Rondonópolis. Os perfis genéticos V1, V6, V8, V10 e V17 foram observados cada um em duas amostras de lesões granulomatosas analisadas. Os perfis genéticos remanescentes (V4, V5, V7, V9, V11, V13, V14, V15, V16, V18, V19, V20, V21, V22, V23, V24, V25, V26, V27) foram observados cada um deles em um isolado de *M. bovis* oriundo de uma propriedade rural.

Figura 2- Distribuição geográfica dos perfis genéticos de isolados de *M. bovis*.

Tabela 6 - Perfil VNTR dos isolados de *M. bovis* em amostras obtidas a partir de carcaças em matadouros-frigoríficos sob SIF e SISE no Estado de Mato Grosso, de acordo com a propriedade de origem dos bovinos.

Propriedade	Município	Index de designação	Nº de amostras isoladas
1	COTRIGUAÇU	V1	1
2	RONDONÓPOLIS	V2	1
3	JUSCIMEIRA	V2	1
4	GUIRATINGA	V3	1
5	DOM AQUINO	V4	1
6	JACIARA	V5	1
7	NOBRES	V2	1
8	SORRISO	V6,V8,V11,V22	5
9	CAMPO VERDE	V7	1
10	NOVA XAVANTINA	V3	1
11	CAMPO NOVO DO PARECIS	V8	1
12	NOVA BANDEIRANTES	V9	1
13	SÃO JOSÉ DO RIO CLARO	V10	1
14	NOVA MARILÂNDIA	V12,V13	4
15	RONDONÓPOLIS	V14	1
16	NORTELÂNDIA	V15	1
17	BARRA DO GARÇAS	V16	1
18	COLÍDER	V17	2
19	JACIARA	V1,V18	2
20	ITIQUEIRA	V19	1
21	JUÍNA	V12	1
22	NOVO SÃO JOAQUIM	V3	2
23	TESOURO	V20	1
24	CAMPO NOVO DO PARECIS	V10,V21	2
25	JUSCIMEIRA	V23	1
26	TERRA NOVA DO NORTE	V24	1
27	SANTO AFONSO	V2	1
28	JUÍNA	V25	1
29	ARENÁPOLIS	V12,V26	3
30	TANGARÁ DA SERRA	V27	1
31	NOVO SÃO JOAQUIM	V3	2
32	ÁGUA BOA	V28	1
33	RONDONÓPOLIS	V28	1
34	NOVA XAVANTINA	V2	1
35	BARRA DO GARÇAS	V28	1
TOTAL			49

4.3 ANÁLISE DE *CLUSTER*

Um dendograma baseado em dados obtidos na discriminação de MIRU-VNTR foi construído usando o algoritmo UPGMA e os resultados mostrados na figura 3. Os casos de TB foram definidos como *cluster* quando 2 ou mais isolados de *M. bovis* de diferentes amostras analisadas apresentaram idêntico perfil genético. Usando 100% de similaridade como definição para *cluster*, 30 amostras agruparam-se em 9 *clusters* (5 *clusters* de 2 isolados, 1 *cluster* de 3 e 5 isolados cada e 2 *clusters* de 6 isolados) e 19 representaram genótipos individuais.

O *cluster* A é compartilhado por 2 isolados obtidos de diferentes propriedades localizadas em Cotriguaçu e Jaciara, respectivamente, assim como o *cluster* D e H são compartilhados cada um por dois isolados oriundos dos municípios de Campo Novo do Parecis e Sorriso para o primeiro *cluster* e São José do Rio Claro e Campo Novo do Parecis para o segundo *cluster* (Figura 4). Os *clusters* B e I foram obtidos de isolados oriundos de propriedades únicas nos municípios de Colíder e Sorriso, respectivamente. O *cluster* C é representado por 5 isolados oriundos de diferentes propriedades nos municípios de Rondonópolis, Juscimeira, Santo Afonso, Nova Xavantina e Nobres. No *cluster* E, coexistiu o perfil genético em 3 propriedades diferentes localizadas em Água Boa, Rondonópolis e Barra do Garças. Dois *clusters* (F e G) com seis isolados em cada foram observados através da análise de amostras coletadas de 4 propriedades localizadas em 3 municípios diferentes e 3 propriedades em diferentes localidades, respectivamente.

Figura 3- Dendrograma da distribuição de 49 isolados de *M. bovis* procedentes de 35 propriedades em 26 municípios do Estado de Mato Grosso. As cores representam os municípios de origem dos animais. N° de ordem é um número sequencial de 1 a 49. ID é a identificação de cada amostra seguida do número de identificação de cada propriedade.

Figura 4- Distribuição geográfica de 9 *clusters* identificados e distribuídos em 18 municípios do Estado de Mato Grosso.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS CLONAIS

A relação entre os isolados foi analisada pelo cálculo da frequência do *locus* variante usando o *minimum spanning tree* (MST). A partir da comparação dos perfis genéticos determinados no estudo, as cepas genotipicamente relacionadas foram organizadas em complexos clonais conforme descrito em estudos anteriores (ALLIX-BEGUEC et al., 2008; WENIGER et al., 2010; RODWELL et al., 2012) e representadas na figura 5. O complexo clonal foi definido como um grupo de cepas contendo não mais de uma variação de *locus* (SLV).

As amostras foram agrupadas em 3 complexos clonais (CC1, CC2 e CC3), sendo V3 o fundador do complexo clonal 1, indicando o genótipo que aparece com maior frequência entre os isolados. Os genótipos ancestrais dos complexos clonais 2 e 3 foram V12 e V6, respectivamente.

O CC1 representa o maior complexo clonal com 27 isolados e o mais diverso, com 13 diferentes perfis genéticos, nenhum deles diferente por mais de um *locus* (V1, V2, V3, V4, V8, V17, V18, V20, V23, V24, V25, V26, V28). O CC2 revelou 7 isolados e 2 perfis genéticos diferentes (V12 e V13) e o CC3 apresentou 4 isolados e 3 perfis genéticos diferentes (V6, V11 e V14).

O complexo clonal 1 formou-se a partir de isolados oriundos de 19 municípios diferentes no Estado de Mato Grosso (Rondonópolis, Água Boa, Barra do Garças, Arenópolis, Novo São Joaquim, Guiratinga, Nova Xavantina, Juína, Juscimeira, Santo Afonso, Nobres, Sorriso, Campo Novo do Parecis, Colíder, Tesouro, Jaciara, Cotriguaçu, Dom Aquino e Terra Nova do Norte). O CC2 foi constituído de isolados dos municípios de Nova Marilândia, Juína e Arenópolis, enquanto o CC3 conteve isolados de Sorriso e Rondonópolis.

Somente 5 propriedades do total de 35 revelaram heterogeneidade ao ser identificado de 2 a 4 genótipos diferentes por propriedade. As demais foram homogêneas.

Figura 5- *Minimum spanning tree* (MST) de 49 isolados de *M. bovis* com 28 tipos de MIRU-VNTR obtidos com a análise de 24 *loci*. As cores nos círculos indicam os municípios que originaram as amostras analisadas. Entre parêntese, o número da propriedade de origem ao lado do index de designação (em negrito). Círculos com mais de uma cor indicam isolados com um mesmo perfil genotípico, mas procedentes de municípios diferentes. As linhas (contínua forte, fraca e tracejada) indicam a diferença de 1 a 3 *loci* entre os genótipos, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

Tomando-se como base o número amostral e a constatação de lesões compatíveis com TB nas linhas de Inspeção de matadouros-frigoríficos sob Inspeção Estadual e Federal no Estado de Mato Grosso, a frequência de amostras analisadas no estudo e caracterizadas como *M. bovis* ao isolamento e à PCR foi de 32,33%. Salazar (2005) obteve isolamento de colônias com morfologia compatível a *M. bovis* em 22,22% (6/27) das amostras analisadas oriundas de três matadouros-frigoríficos sob inspeção Estadual em Mato Grosso. Diferentemente, Furlanetto et al. (2012) identificaram apenas 1,51% (3/198) de amostras com crescimento de colônias compatíveis a *M. bovis*. O DNA de *M. bovis* foi detectado em 7,07% (14/198) das amostras por PCR múltipla (m-PCR). A divergência comparativa aos resultados de Furlanetto et al. (2012) podem ser decorrentes desse estudo apresentar amostragem composta principalmente por carcaças apresentando linfadenites comuns ou inespecíficas observadas nas linhas de inspeção de matadouros-frigoríficos detentores de SIF no Estado de Mato Grosso.

No presente estudo os valores preditivos positivos do diagnóstico macroscópico realizado pelos inspetores foram de 30,13% para o SIF e 63,64% para o SISE. Isso indica que a prevalência real da doença é maior nos abates do SISE do que no SIF, pois quanto menor a prevalência real da doença, menor também será o valor preditivo positivo do teste para detectá-la. O mesmo foi reportado por Rosales Rodriguez (2005) e Grisi Filho et al. (2011) em estudos realizados no Estado de São Paulo, que justificaram a baixa expectativa da prevalência real da tuberculose na rede SIF devido ao abate quase que exclusivo de gado de corte, que nos Estados brasileiros é predominantemente criado extensivamente, ambiente que dificulta a transmissão da tuberculose.

Cenário oposto ocorre na rede Estadual, com o abate concentrando-se em animais de descarte oriundos de pequenas propriedades com aptidão originalmente leiteira ou mista, onde a TB ocorre com maior frequência. Essas hipóteses foram corroboradas por Dias et al. (2016), que detectaram como fatores de risco para TB no Estado de São Paulo as explorações de leite e mistas, sobretudo as de leite de alta produção, com utilização de ordenha mecânica. Néspoli et al. (2016) verificou que o mesmo ocorre no Estado de Mato Grosso, ou seja, na região a TB está associada às propriedades de leite com alta produção.

A frequência de bovinos abatidos em todos os matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de Mato Grosso foi 4.118.183 em 2015, 4.146.437 em 2016 e 4.349.665 em 2017 (MAPA, 2018). Enquanto no SISE foram abatidos um total de 345.067 bovinos no ano de 2015, 388.659 em 2016 e 329.957 em 2017. Portanto, o volume de abate em estabelecimentos sob SIF é maior que os realizados sob SISE, o que pode favorecer a coleta de um quantitativo maior de amostras de lesões granulomatosas nesses estabelecimentos.

Técnicas de genotipagem molecular são consideradas importantes ferramentas para o rastreamento epidemiológico da TB, visto que nos permitem identificar e distinguir os isolados de *M. bovis*, obter a distribuição geográfica das cepas, as possíveis rotas de transmissão, origem dos surtos bem como traçar estratégias a fim de dificultar ou impedir sua transmissão. O MIRU-VNTR é considerado o padrão ouro para a genotipagem do complexo *M. tuberculosis*, uma vez que é altamente discriminatório e reprodutível (WENIGER et al. 2010).

No estudo, foram analisados 49 isolados de *M. bovis* oriundos de bovinos abatidos no Estado de Mato Grosso, através da técnica de MIRU-VNTR utilizando 24 pares de *primers*. O *locus* QUB26 apresentou alto poder discriminatório ($h=0,66$). Comparativamente, os *loci* QUB3232, ETRA e B, MIRU 24 e 26 foram altamente discriminativos em Chad (HILTY et al., 2005), assim como QUB (11a, 26, 3232), ETR (A, B) e MIRU 26 nos *M. bovis* isolados na Irlanda (RORING et al., 2004) e QUB (11a, 11b, 3232, 3336), ETR (A, B) e MIRU 26 na Bélgica (ALLIX et al., 2006). No estudo, os *loci* ETRC (0,54), Mtub21 (0,5), QUB11b (0,33) e Mtub34 (0,31) mostraram moderada diversidade alélica, sendo semelhante aos resultados de Jeon et al. (2008) e Boniotti et al. (2009). Contudo, Figueiredo et al. (2011) e Carvalho et al. (2016) em estudos prévios conduzidos na região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil observaram alta diversidade alélica nos *loci* ETR (A, B, C) e QUB11b. No estudo de Parreiras et al. (2012), apenas o MIRU 16 e 26 mostraram considerável poder discriminatório e total ausência de diversidade para MIRU 10, 20, 23 e 39.

Os *loci* Mtub 04, MIRU 04, MIRU 40, MIRU 16, ETRA, Mtub 29, ETRB, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 26, MIRU 27, MIRU 31, Mtub 39, QUB 4156 e MIRU 39 revelaram baixo poder discriminatório ($h=0,02 - 0,27$), corroborando resultados encontrados por Ramos et al. (2014) na região sul do Brasil que observaram ETRB e MIRU 26 com baixo poder discriminatório. Jeon et al. (2008) também mostraram resultados semelhantes nos *loci* MIRU26, ETRB, QUB1895 e VNTR 0424 de *M. bovis* isolados

na Coréia. Quatro *loci* (MIRU2, MIRU10, MIRU20 e Mtub30) não apresentaram diversidade alélica. Esses achados estão em concordância com dados publicados que mostraram nenhuma ou baixa diversidade alélica nos *loci* MIRU 2, 4, 10, 20, 23, 24, 27, 31, 39 e 40 (RORING et al., 2004).

Entre os seis conjuntos de *loci* MIRU-VNTR analisados na tabela 5, os ETRs e QUBs revelaram alto polimorfismo, enquanto os MIRUs mostraram baixo polimorfismo. Esses resultados são consistentes com prévios estudos que mostraram alto poder discriminatório daqueles marcadores na genotipagem do *M. bovis* e *M. tuberculosis* (FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998; SKUCE et al., 2002; BO-YOUNG et al., 2008). Contudo, os MIRUs têm alto poder discriminatório para *M. tuberculosis*, mas não para os isolados de *M. bovis* (MAZARS et al., 2001; SUPPLY et al., 2001; COWAN et al., 2002; HILTY et al., 2005; ALLIX et al., 2006). Ao reduzir o número de *loci* na análise, observou-se uma diminuição do poder discriminatório dos isolados estando em concordância com os resultados obtidos por Roring et al. (2004), Allix et al. (2006) e Boniotti et al. (2009). Devido ao baixo poder discriminatório, estudos atuais sugerem o uso de um conjunto de 15 *loci* para estudos epidemiológicos moleculares e 24 *loci* para estudos filogenéticos (SUPPLY et al., 2006).

Hunter e Gaston (1988) sugeriram o uso de um índice numérico de discriminação baseado na probabilidade de duas amostras, não correlacionadas de uma população teste, serem identificadas como pertencentes a diferentes grupos. Essa probabilidade calculada pelo índice de discriminação de Hunter e Gaston (HGDI) foi desenvolvida a partir do índice de Simpson (SIMPSON, 1949) para a descrição da diversidade de espécies em um determinado habitat ecológico. Segundo os autores, um teste para estudos epidemiológicos é considerado eficiente quando possuir um índice de discriminação de pelo menos 90%. No estudo, obtivemos um índice de discriminação de 96%.

Foram identificados 28 perfis genéticos distribuídos em 35 propriedades no Estado de Mato Grosso. Carvalho et al. (2016) observaram 9 perfis genéticos diferentes em 10 isolados de *M. bovis* obtidos de animais com resultado positivo ao teste tuberculínico intradérmico no Estado de Mato Grosso.

Presume-se que isolados obtidos do mesmo rebanho sejam geneticamente mais semelhantes que as cepas obtidas de diferentes regiões (PERUMAALLA et al., 1999). Porém, infere-se no estudo a heterogeneidade genética nas propriedades 8 (perfis genéticos V6, V8, V11, V22), 14 (perfis genéticos V12 e V13), 19 (perfis

genéticos V1 e V18), 24 (perfis genéticos V10 e V21) e 29 (perfis genéticos V12 e V26). Provavelmente reflete a ampla diversidade da origem geográfica dos animais introduzidos nas propriedades e o frequente movimento de animais entre diferentes propriedades (RAMOS et al., 2014).

Analisando o histórico de movimentação de bovinos nas propriedades 8, 14, 19, 24 e 29 para o período de estudo através dos registros das guias de trânsito animal constantes nas guias acompanhatórias das amostras de lesões, observou-se que os registros de entrada nas propriedades com finalidade de engorda e reprodução variaram respectivamente de 2 a 1.288 e 5 a 21, o que caracteriza regiões com grandes centros de comercialização de bovinos para engorda. O controle da movimentação orientada pela finalidade do comércio, o conhecimento do saneamento da propriedade de origem e a avaliação das propriedades localizadas em áreas consideradas como de risco para reintrodução de enfermidades constituem-se em medidas de prevenção de grande valia para reduzir o espalhamento de enfermidades (NEGREIROS, 2010).

Somente nas propriedades 8 em Sorriso e 22 em Novo São Joaquim foram isolados *M. bovis* em amostras com diferentes datas de coleta. A persistência de infecção nas explorações pode não ser, em alguns casos, devido à falha de testes diagnósticos, mas sim a existência de um risco contínuo de reinfecção, como o que ocorre no comércio de gado, contato com animais selvagens infectados ou com medidas inadequadas de biossegurança (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2013). Informações coletadas em relatório de visita realizada pelo Serviço Veterinário Oficial no Estado de Mato Grosso mostraram que a propriedade 8 no município de Sorriso tem finalidade essencialmente de engorda e confina animais de descarte oriundos de outras propriedades do mesmo proprietário ou de outros, indicando o risco de reinfecção no comércio de animais.

A distribuição espacial das cepas de *M. bovis* revela a existência de isolados com o mesmo perfil MIRU-VNTR entre diferentes regiões geográficas no Estado de Mato Grosso: Jaciara e Cotriguaçu (V1), Santo Afonso, Rondonópolis, Juscimeira, Nobres e Nova Xavantina (V2), Novo São Joaquim, Guiratinga e Nova Xavantina (V3), Sorriso e Campo Novo do Parecis (V8), São José do Rio Claro e Campo Novo (V10), Juína, Arenópolis e Nova Marilândia (V12) Água Boa, Rondonópolis e Barra do Garças (V28), que denotam o movimento de animais entre elas. Esta permuta de perfis genéticos provavelmente está relacionada a fatores econômicos como o comércio de

animais infectados e a proximidade geográfica, pois regiões contíguas podem facilitar o movimento de animais entre elas (DJEMAL et al., 2017).

A genotipificação através dos 24 MIRU-VNTR e a criação de UPGMA baseada na similaridade dos genótipos resultou em 9 *clusters* contendo 61,22% (30/49) dos isolados de *M. bovis*. O *cluster* é representado por amostras de bovinos infectados com a mesma cepa, que pode ser resultante de contato direto entre eles ou pela transmissão através de intermediários ou entre bovinos não relacionados. NEGREIROS (2010) observou que 81,54% do rebanho bovino em Mato Grosso está concentrado em 20% das propriedades, indicando a existência de poucas propriedades com intensa comercialização para abate, engorda ou reprodução e muitas propriedades com pouca comercialização. O percentual de movimentação interestadual no estudo foi de 2,65% dos animais movimentados, predominando as movimentações intraestaduais. Essa característica da rede de movimentação de bovinos pode ter implicações no espalhamento de doenças infecciosas nos rebanhos, em função do contato entre grandes e pequenos estabelecimentos.

Os 19 genótipos individuais observados no estudo podem ser originados de infecções latentes de tuberculoses reativadas, adquiridas distantemente no tempo e espaço (MATHEMA et al., 2008; SMALL et al., 1994) ou sugere adição constante de genótipo exógeno único na população de animais.

Complexos clonais foram definidos como grupos de cepas com até um *locus* MIRU de diferença entre eles, presumivelmente representando um grupo de cepas geneticamente relacionadas (ALLIX-BEGUEC et al., 2008; WENIGER et al., 2010). No estudo, os dados analisados revelaram a presença de três complexos clonais sendo que o principal (CC1), apresentou os perfis genéticos mais frequentes V2 e V3, compostos por isolados oriundos de 19 municípios diferentes do Estado de Mato Grosso. A predominância de um determinado perfil genético pode refletir uma melhor adaptação da cepa ao ambiente e/ou hospedeiro (SMITH, 2012).

Os demais complexos clonais (CC2 e CC3) apresentaram isolados de 3 e 2 municípios diferentes, respectivamente. A distribuição de isolados de *M. bovis* com os mesmos perfis genéticos em diferentes regiões sugere a ocorrência de trânsito de animais nessas regiões ou diferentes fontes de infecção (SALES, 2012).

O CC3 apresentou-se mais distante dos demais complexos clonais e não parece estar intimamente relacionado com quaisquer outros perfis genéticos do conjunto de dados disponíveis.

6 CONCLUSÕES

1) Foram identificadas 54 amostras de lesões granulomatosas que apresentaram isolados de *M. bovis*, sendo 49 submetidos à técnica de MIRU-VNTR.

2) Os valores preditivos positivos do diagnóstico macroscópico da TB verificados nas redes SIF e SISE de inspeção indicaram que os estabelecimentos de abate sob inspeção Estadual têm especial relevância na estruturação de sistemas de vigilância para detecção e saneamento de focos.

3) A discriminação molecular através da técnica de MIRU-VNTR permitiu identificar 28 perfis genéticos diferentes, que se agruparam em 9 *clusters* e 19 isolados que representaram genótipos individuais.

4) O complexo clonal 1 representou o maior complexo clonal, com 27 isolados e o mais diverso, com 13 diferentes perfis genéticos. Esse complexo foi identificado em amostras de lesões granulomatosas oriundas de 19 municípios diferentes do Estado de Mato Grosso e representam áreas consideradas de risco para reintrodução de TB, necessitando um controle mais rigoroso da movimentação de bovinos com o conhecimento do saneamento da propriedade de origem.

5) O isolamento, seguido da identificação e discriminação moleculares constituem fontes de relevantes informações para auxiliar no desenvolvimento de estratégias de erradicação da TB no Estado de Mato Grosso.

REFERÊNCIAS

ANZAI, E. K.; COSTA, D.; SAID, A. L. P. R.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GALVIS, J. O. A.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; FERREIRA NETO, J. S. An update on the epidemiological situation of bovine brucellosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3437-3448, 2016.

AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, E.M.D.; RODRIGUEZ, C.A.R.; FERREIRA NETO, J.S.; AMAKU M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p.241-244, 2008.

ALLIX, C.; WALRAVENS, K.; SAEGERMAN, C.; GODFROID, J. SUPPLY, P.; FAUVILLE-DUFAUX, M. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, 44, 1951-1962, 2006.

ALLIX-BEGUEC, C.; HARMSSEN, D.; WENIGER, T.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.8, p.2692-2699, 2008.

BAHIENSE, L.; ÁVILA, L. N.; BAVIA, M. E.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; GRISI-FILHO, J. H. H.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3549-3560, 2016.

BELCHIOR, A.P.C.; LOPES, L.B.; GONÇALVES, V.S.P.; LEITE, R.C. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v.48, p.373-378, 2016. (campo realizado em 1999)

BO-YOUNG, JEON.; SUNGMO, J. E.; JINHEE, PARK.; YEUN, KIM.; EUN-GAE, LEE.; HYEYOUNG, LEE.; SANGKYO, SEO.; SANG-NAE, CHO. Variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 145-153, 2008.

BONIOTTI, M.B.; GORIA, M.; LODA, D.; GARRONE, A.; BENEDETTO, A.; MONDO, A.; TISATO, E.; ZANONI, M.; ZOPPI, S.; DONDO, A.; TAGLIABUE, S.; BONORA, S.; ZANARDI, G.; PACCIARINI, M.L. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p. 636-644, 2009.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e a Tuberculose Animal (PNCEBT)**: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 184p, 2006.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 10 de 3 de março de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 jun. 2017. Seção 1, págs 4-8.

BROSCH, R.; GORDON, S.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L.M.; PYM, A.S.; SAMPER, S.; VAN SOLLIGEN, D.; COLE, A. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of National Academy of sciences of the United States of America**, v.99, n.6, p.3684-3689, 2002.

CARVALHO, R.C.T.; VASCONCELLOS, S.E.G.; ISSA, M.A.; SOARES FILHO, M.P.M.; MOTA, P.M.P.C.; ARAÚJO, F.R.; CARVALHO, A.C.S.; GOMES, H.M.; SUFFYS, P.N.; FIGUEIREDO, E.E.S.; PASCHOALIN, V.M.F. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* from cattle reared in Midwest Brazil. **Plos one**, v, 11, n. 9, 2016.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis animal**. Buenos Aires, 1972. (Nota técnica, 26).

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Tuberculosis**. Bacteriologia de la tuberculosis: el cultivo del *Mycobacterium tuberculosis*. Buenos Aires: CPZ, 1985. (Nota técnica, 27).

CORNER, L.A.; TRAJSTAMAN, A.C. Evaluation of 1-Hexadecylpyridinium Chloride as a Decontaminant in the Primary Isolation of *Mycobacterium bovis* from Bovine Lesions. **Veterinary Microbiology**, n. 18, p. 127-134, 1988.

COWAN, L.S.; MOSHER, L.; DIEM, L.; MASSEY, J.P.; CRAWFORD, J.T. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy

numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1592-1602, 2002.

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, n. 2, p. 77–109, 2006.

DIAS, R.A.; STANOJLOVIC, F.M.U.; BELCHIOR, A.P.C.; FERREIRA, F.S.; GONÇALVES, R.C.; BARÃO, R.S.C.; SOUSA, P.R.; SANTOS, A.M.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E.O.; GRISI FILHO, J.H.H.; GONÇALVES, V.S.P.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA NETO, J.S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3673-3684, 2016.

DJEMAL, S.E.; SIALA, M.; SMAOUI, S.; KAMMOUN, S.; MAROUANE, C.; BEZOS, J.; MESSADI-AKROUT, F.; ROMERO, B.; GDOURA, R. Genetic diversity assessment of Tunisian *Mycobacterium bovis* population isolated from cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 13, 393-401, 2017.

FERREIRA NETO, J.S.; SILVEIRA, G.B.; ROSA, B.M.; GONÇALVES, V.S.P.; GRISI-FILHO, J.H.H.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, E.O.; LAGE, A.P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3385-3402, 2016.

FIGUEIREDO, E.E.; RAMOS, D.F.; MEDEIROS, L.; SILVESTRE, F.G.; LILENBAUM, W.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.; DELLAGOSTIN, O.A. Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. **The veterinary journal**, v. 193, p.296-298, 2011.

FROTHINGHAM, R.; MEEKER-O'CONNELL, W.A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. **Microbiology**, v. 144, p. 1189-1196, 1998.

FURLANETTO, L.V.; FIGUEIREDO, E.E.S.; CONTE JÚNIOR, C.A. *et al.* Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1138-1144, 2012.

GARCIA-SAENZ, A.; NAPP, S.; LOPEZ, S. CASAL, J.; ALLEPUZ, A. Estimation of the individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in

Catalonia (North-Eastern Spain), **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, p. 332-337, 2015.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P.R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B.G.; COLE, S.T.; GORDON, S.V.; HEWINSON, R.G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 100, p. 7877-7882, 2003.

GRISI FILHO, J.H.H.; ROSALES, C.A.R.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S. Epidemiological analysis of the bovine tuberculosis condemnations in abattoirs in the state of São Paulo, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 175-181, 2011.

GUEDES, I. B.; BOTTENE, I. F. N.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LEAL FILHO, J. M.; HEINEMANN, M. B.; AMAKU, M.; GRISI-FILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3579-3588, 2016.

HILTY, M.; DIGUIMBAYE, C.; SCHELLING, E.; BAGGI, F.; TANNER, M.; ZINSSTAG, J. Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p.217-222, 2005.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing system: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p.2465-2466, 1988.

INDEA – Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso. Estabelecimentos registrados no SISE. Disponível em: <<http://www.indea.mt.gov.br/inspecao-de-produtos-de-origem-animal>>. Acesso em 30 mar. 2018.

JEON, B.Y.; JE, S.; PARK, J.; KIM, Y.; LEE, E.G.; LEE, H.; SEO, S.; CHO, S.N. Variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea, **Journal of Veterinary Science**, v.9, n. 2, p. 145-153, 2008.

KANTOR, I.N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin 342 American and Caribbean countries. **Veterinary microbiology**, v.112, n.2-4, p.111-118, 2006.

KEIM, P.; KLEVYTSKA, A.M.; PRICE, L.B.; SCHUPP, J.M.; ZINSER, G.; SMITH, K.L.; HUGHJONES, M.E.; OKINAKA, R.; HILL, K.K.; JACKSON, P.J. Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 215-217, 1999.

KREMER, K.; ARNOLD, C.; CATALDI, A.; GUTIERREZ, M.C.; HAAS, W.H.; PANAIOTOV, S.; SKUCE, R.A.; SUPPLY, P.; VAN DER ZANDEN, A.G.M.; VAN SOOLINGEN, D. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis complex* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.5628-5639, 2005.

LE FLECHE, P.; HAUCK, Y.; ONTENIENTE, L.; PRIEUR, A.; DENOEUDE, F.; RAMISSE, V.; SYLVESTRE, P.; BENSON, G.; RAMISSE, F.; VERGNAUD, G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BMC Microbiology**, v.1, n.2, 1471-2180, 2001.

LIMA, P. B.; NASCIMENTO, D. L.; ALMEIDA, E. C.; PONTUAL, K. A. Q.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GONÇALVES, V. S. P.; TELLES, E. O.; GRISI-FILHO, J. H. H.; HEINEMANN, M. B.; SILVA, J. C. R.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Pernambuco, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p. 3601-3610, 2016.

MACHADO, A.; RITO, T.; GHEBREMICHAEL, S.; MUHATE, N.; MAXHUZA, G.; MACUAMULE, C.; MOIANE, I.; MACUCULE, B.; MARRANANGUMBE, A.S.; BAPTISTA, J.; MANGUELE, J.; KOIVULA, T.; STREICHER, E.M.; WARREN, R.M.; KALLENIOUS, G.; HELDEN, P.V.; CORREIA-NEVES, M. Genetic diversity and potential routes of transmission of *Mycobacterium bovis* in Mozambique. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.12, n.1, 2018.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relação de Estabelecimentos registrados no SIF**. Disponível em:<http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?sigcif_cons&estabelecimentos> Acesso em: 30 mar. 2018.

MATHEMA, B.; KUREPINA, N.; FALLOWS, D.; KREISWIRTH, B.N. Lessons from molecular epidemiology and comparative genomics. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, p. 467–480, 2008.

MATO GROSSO. Secretaria de Estado, Desenvolvimento Rural e Agricultura Familiar. Portaria Conjunta SEDRAF-INDEA/MT, N° 009, de 14 de novembro de

2014. Disponível em: <<http://www3.indea.mt.gov.br/download.php?id=283859>>
Acesso em: 23 jan. 2018.

MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A.L.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYREC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **PNAS**, v. 98, n.4, p. 1901-1906, 2001.

MICHEL, A.L., MÜLLER, B. E VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal human interface: a problem, or not? **Veterinary Microbiology**, 140 (3-4), p. 371–381, 2010.

NEGREIROS, R.L. **Caracterização e análise da rede de movimento de bovinos no Estado de Mato Grosso**. 2010. 121f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

NÉSPOLI, J.M.B. **Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso**. 2012. 46f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

NÉSPOLI, J. M. B.; NEGREIROS, R. L.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3589-3600, 2016.

PARREIRAS, P.M. **Tipificação de *Mycobacterium bovis* utilizando spoligotyping e MIRU-VNTR e avaliação da sensibilidade à quimioterápicos de estirpes isoladas em Minas Gerais e de outras regiões brasileiras**. 2003, 39f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2003

PARREIRAS, P.M.; ANDRADE, G.I.; NASCIMENTO, T.F.; OELEMANN, M.C.; GOMES, H.M.; ALENCAR, A.P.; ASSIS, R.A.; MOTA, P.M.P.C.; PEREIRA, M.A.S.; LOBATO, F.C.F.; LAGE, A.P.; SUFFYS, P.N. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 64-73, 2012.

PERUMAALLA, V.S.; ADAMS, I.G.; PAYEUR, J.; BACA, D.; FICHT, T.A. Molecular fingerprinting confirms extensive cow to cow intra-herd transmission of a single *Mycobacterium bovis* strain. **Veterinary microbiology**, v. 70, p. 269-276, 1999.

QUEIROZ, M. R.; GROFF, A. C. M.; SILVA, N. S.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P. FERREIRA, F. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3647-3658, 2016.

RAMOS, D.F.; SILVA, A.B.S.; FAGUNDES, M.Q.; VON GROLL, A.; SILVA, P.E.A.; DELLAGOSTIN, O.A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the south of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, V. 45, n. 2, p. 657-660, 2014.

RIBEIRO, L. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FRANCISCO, P. F. C.; MOTA, A. L. A. A.; NASCIMENTO, G. T.; LICURGO, J. B.; FERREIRA, F.; GRISI-FILHO, J. H. H.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; BORGES, J. R. J. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3561-3566, 2016.

ROCHA, W. V.; JAYME, V. S.; MOTA, A. L. A. A.; BRITO, W. M. E. D; PIRES, G. R. C; GRISI-FILHO, J. H. H; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Goiás, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3625-3628, 2016.

RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; NAVARRO, Y.; ROMERO, B.; DE JUAN, L.; BEZOS, J.; MATEOS, A.; GOLBY, P.; SMITH, N.H.; HEWINSON, G.R.; DOMÍNGUEZ, L.; GARCÍA-DE-VIDEIRA, D.; ARANAZ, A. Splitting of a Prevalent *Mycobacterium bovis* Spoligotype by VariableNumber Tandem-Repeat Typing Reveals High Heterogeneity in an Evolving Clonal Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3658-3665, 2013.

RODWELL, T.C.; KAPASI, A.J.; BARNES, R.F.W.; MOSER, K.S. Factors associated with genotype clustering of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in an ethnically diverse region of Southern California, United States. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1917-1925, 2012.

RORING, S.; SCOTT, A.N.; HEWINSON, R.G.; NEILL, S.D.; SKUCE, R.A. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. **Veterinary microbiology**, v. 101, p. 65-73, 2004.

ROSALES RODRIGUEZ, C.A. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e**

epidemiológicos. 2005. 86f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

SALAZAR, F.H.P. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil.** 2005. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2005

SALES, E.B. **Genotipagem de *Mycobacterium bovis* pelo Multispacer Sequence Typing.** 2012. 65f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012.

SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N. WHITTAM, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied Environmental Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 873-884, 1986.

SILVA, M. C. P.; GONÇALVES, V. S. P.; MOTA, A. L. A. A.; KOLODA, M.; FERREIRA NETO, J. S.; GRISIFILHO, J. H. H; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E. O.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; ALFIERI, A. A.; MULLER, E. E. Prevalence and herd-level risk factors for bovine tuberculosis in the state of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p. 3611-3624, 2016.

SKUCE, R.A.; MCCORRY, T.P.; MCCARROLL, J.F.; RORING, S.M.M.; SCOTT, A.N.; BRITAIN, D.; HUGHES, S.L.; HEWINSON, R.G.; NEIL, S.D. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. **Microbiology**, v. 148, 519-528, 2002.

SMITH, N.H. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 857-865, 2012.

SOLA C, FILLIOL IF, LEGRAND E, LESJEAN S, LOCHT C, SUPPLY P, RASTOGI N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRU-VNTR's: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, p.125-133, 2003.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RUSCHGERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; DE, H.P.; VAN, D.H.; RORING, S.; BIFANI, P.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; VATIN, V.; GUTIERREZ, M.C.; FAUVILLE, M.; NIEMANN, S.; SKUCE, R.; KREMER, K.; LOCHT, C.; VAN, S.D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial

interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4498-4510, 2006.

SUPPLY P. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide, **Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille**, 2005. Disponível em: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf>

SUPPLY, P.; WARREN, R.M.; BANULS, A.L.; LESJEAN, S.; VAN DER SPUIY, G.D.; LEWIS, L.A.; TIBAYRENC, M.; VAN HELDEN, P.D.; LOCHT, C. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 529–538, 2003.

SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; LOCHT, C.; Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3563-3571, 2001.

SMALL, P.M.; HOPEWELL, P.C.; SINGH, S.P.; PAZ, A.; PARSONNET, J.; RUSTON, D.C.; SCHECTER, G.F.; DALEY, C.L.; SCHOOLNIK, G.K. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 1703-1709, 1994.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature Research Journals**, v. 163, p. 688, 1949.

VAN BELKUM, A.; SCHERER, S.; VAN ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 62, n. 2, p. 275-293, 1998.

VELOSO, F. P.; BAUMGARTEN, K. D.; MOTA, A. L. A. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GRISI-FILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; GONÇALVES, V. S. P. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3659-3672, 2016.

VENDRAME, F. B.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3639-3646, 2016.

WARREN, R.M.; GEY VAN PITTIUS, N.C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M.C.; CHEGE, G.K.; VICTOR, T.C.; HOAL, E.G.; VAN HELDEN, P.D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.

WENIGER, T.; KRAWCZYK, J.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S.; HARMSSEN, D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n.2, p. w326-w331, 2010.

WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and Identification of Multiple Mycobacterial Pathogens by DNA Amplification in a Single Tube. **Genome Research**, v. 1, p. 269-273, 1992.

ZUMARRAGA, M.J.; Meikle, V.; Bernardelli, A.; Abdala, A.; Tarabla, H.; Romano, M.I.; CATALDI, A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 232-238, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Guia acompanhatória

Lesão suspeita de tuberculose colhida em matadouro	
	Número de frasco (vide verso):

1-DADOS DO MATADOURO

Quem faz a inspeção: () SIF () SISE () SIM	
Nº de registro:	Município:
Nome do estabelecimento:	
Telefone:	email:
Méd. Vet. Encarregado da inspeção:	
Telefone:	email:

2- PROCEDÊNCIA DO ANIMAL

- () Animal abatido em linha de abate normal
- () Animal abatido por ter resultado positivo ao teste tuberculínico

Nº da GTA:	Nº SISBOV:
------------	------------

3- DADOS DA AMOSTRA

Data da coleta:	
Espécie: () Bovina () Bubalina	Sexo: () M () F
Raça bovina (vide verso): () Zebu () Europeu leite () Europeu corte () SRD () Outras raças	
Raça bubalino: () Murrah () Mediterrâneo () Carabao () Jaffarabadi () Outras raças	
Idade: () até 12 meses () 12 a 24 meses () 24 a 36 meses () mais que 36 meses	
Distribuição das lesões na carcaça: () Trato respiratório () Trato digestivo () Genito urinário () Linfonodos da cabeça e pescoço () Úbere () Outro, qual: _____	Material colhido: () Tonsila Linfonodos () Retrofaringeanos () Mesentéricos () Mandibulares () Mediastínicos () Hilo-hepáticos () Sub-ilíacos () Outro, qual: _____ () Pulmão () Fígado () Baço () Úbere () Outro, qual: _____

Carimbo e assinatura do Méd. Vet. encarregado da Inspeção/ Resp. técnico

Número do frasco (amostra)

Composto pelo número do registro do estabelecimento no SIF/SISE/SIM e número sequencial da amostra, separados por uma barra.

Raça predominante

Marcar uma única opção, aquela que melhor caracterize a propriedade de origem. Quando o rebanho for Bovino:

- *Zebu*: qualquer raça de bovino da espécie *Bos indicus*. Exemplo: considera-se raça zebu predominante quando o rebanho for composto por: (1) bovino de uma única raça (ex: nelore); (2) bovino de duas ou mais raças diferentes (ex: nelore e guzerá); (3) bovinos resultantes de cruzamento entre raças zebuínas, independente do grau de sangue (ex: nelore X guzerá).
- *Europeu de leite*: raça de origem europeia, ou seja, bovino da espécie *Bos taurus*, especializadas em produção leiteira, podendo o rebanho ser constituído por animais de uma única raça ou de cruzamentos entre raça desta mesma espécie. Exemplos: holandês e jersey.
- *Europeu de corte*: raça de origem europeia, ou seja, bovino da espécie *Bos taurus*, especializadas em produção carne, podendo o rebanho ser constituído por animais de uma única raça ou de cruzamentos entre raças desta mesma espécie. Exemplos: angus, charolês e simental.
- *Sem raça definida (SRD)*: é o bovino resultante de cruzamento entre raças, não permitindo que ele seja incluído dentro de uma ou mais raças específicas, sendo, portanto, considerado como sem raça definida (SRD).
- *Outras raças*: todas as categorias que não se enquadrarem nas opções acima. São incluídos aqui bovinos resultantes de cruzamentos entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, que dão origem ao gado cruzado (europeus X zebu), independente do grau de sangue. (ex: girolanda, cruzamento industrial).