OSVALDO FREDERICO INLAMEA

**Mapeamento e distribuição dos isolados do complexo
Mycobacterium tuberculosis provenientes de casos de tuberculose
bovina em Moçambique**

São Paulo

2018

OSVALDO FREDERICO INLAMEA

Mapeamento e distribuição dos isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de casos de tuberculose bovina em Moçambique

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental 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:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

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. 3643
FMVZ

Inlamea, Osvaldo Frederico

Mapeamento e distribuição dos isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de casos de tuberculose bovina em Moçambique / Osvaldo Frederico Inlamea. – 2018.

104 p. : 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 Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. MIRU-VNTR. 3. *Spoligotyping*. 4. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. 5. Moçambique. I. Título.

CERTIFIED

We certify that the Research "Mapping of the distribution of Mycobacterium bovis strains involved in bovine tuberculosis in Mozambique", protocol number CEUAX 6755081216, under the responsibility José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day April 06, 2017.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Mapeamento da distribuição dos isolados do complexo Mycobacterium tuberculosis provenientes de casos de tuberculose bovina em Moçambique", protocolado sob o CEUAX nº 6755081216, sob a responsabilidade de José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 06 de abril de 2017.

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

Claudia Madalena Cabrera Mori
Vice-Presidente
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: INLAMEA, Osvaldo Frederico

Título: Mapeamento e distribuição dos isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de casos de tuberculose bovina em Moçambique

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos que vieram antes mim:

*Aos meus pais **Félix Vitrinho Inlamea** e*

Madalena Frederico Magalhães

*Ao **Jorge Traquino** o companheiro e camarada*

In memoriam

A todos os contribuíram para o meu desejo de questionar e muitas vezes não
encontrar resposta.

Aos que virão e que este trabalho sirva de inspiração

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus!

Sem ti nada disso seria possível.

Agradeço a minha família que sempre questionaram o porquê de sair da zona de conforto e seguir em busca de conhecimento, Harridas Madina, Danny Francelina, Belarmino Felismino, Celso Vitrinho, Alice Soares, Regina Boi, Rachid Pedro, Dilvana Traquino, Cheizel Octavio e Melaine Odvalda amo-vos com eterno amor e me desculpem pelas ausências.

Aos meus tios, tias, primos, primas, sobrinhos e sobrinhas e a toda família em geral, meu muito obrigado.

A Maitê Freitas, minha amada, obrigado por tudo que és na minha vida. Te amo. Elizabete Oliveira, Luiz Rosa de Freitas e Agnis Freitas vocês são uns amores, obrigado por me receberem em vossa família.

A família PGCD (Programa de Pós-Graduação Ciência para Desenvolvimento) e ao Instituto Gulbenkian de Ciências, tudo começou por que vocês acreditaram em mim, obrigado a todos, em especial a Joana Sá, Patrícia Beldade, Carla Semedo, Ines Maciel, Avelino Langa, Daniel Zacarias, Cintia Horta, Neidy Rodrigues, Viriato Mbana, Hugulay Maia, Ana Paula Aguiar, Eliane Carvalho, Elves Heleno, Edison Carvalho, Denise Coutinho e os colegas de outras edições do PGCD.

Um especial agradecimento a Gisele, Sheila, Suely, António, Cassia, Danubia, Israel, Nicolas, Eleine, Juliana, Iracema, Abigail, Sabrina e a Anna. Aos amigos e colegas do laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB), LABMAS, LEB e do VPS em geral.

Ao meu orientador, José Soares Ferreira Neto e ao Prof. Marcos Bryam Heinemann pelos ensinamentos e pela oportunidade de aprender mais e mais.

A todos professores e funcionários do VPS em especial ao Danival e Vanessa pela prontidão em ajudar-nos.

A Professora Adelina Machado, obrigado por criar em mim este gosto pela ciência e o gosto por este tema que a nove anos temos vindo a discutir. Sem você nada disso seria possível. Minha mentora, muito obrigado por trilhar os seus passos.

Aos amigos de Portugal, em especial a Margarida Correia-Neves, obrigado por acreditar em mim. Nuno Santos nossas conversas foram sempre inspiradoras.

Ao José Leal, Ricardo Leite e Paula obrigado pela oportunidade de aprender com vocês.

A Mara Scheffer e a Maria Luiza Bazzo do Hospital Universitário da UFSC, muito obrigado pela disponibilidade em aprender com vocês.

Em Moçambique, a Faculdade de Veterinária da UEM, ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose, ao Laboratório Central de Veterinária, ao Ministério de Agricultura e Segurança alimentar, ao Centro de Biotecnologia da UEM, Centro de Investigação de Saúde de Manhica, ao Matadouro Municipal de Maputo, Matadouro da Machava, Matadouro Municipal da Maxixe e ao Matadouro da Manhica os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos amigos e colegas de Moçambique: Ivania Moiane, Leguesse Masawo, André Nhambir, Yana Chambal, Chenjerai Jairoce, Dércia Miguel, Bendita das Dores, Apolinária Cuamba, Abdul Abudo, Khalide Azan, Samuel Chumane, Sérgio Mozangar, Helder Simões, Gabriel Maxlhuza, Custódia Macuamule, Joaquim Manguete, Emelda Simbine, Charmila Mussagy, Matania Tembe, Miranda, Belisário Moiane, Abel Chilundo, Salsa Ozobra, Marlene van Dunem, Cláudio, Lourenço Mapaco, Dra Sara Achá, Eufrásia Moiana e Lina Matanda, meu muito obrigado pelos momentos de alegria durante a jornada.

Aos amigos do Brasil pelo acolhimento e carinho, encontrei em vocês uma verdadeira família: Lilian Moreira e sua família, Ana Paula, Lucimar, Túlio e família, Giovanni Cangini, Fran, Karine Silva, Sheila Weza, Vini Campos, Patrícia Vaz, Julia Barros, Eder Lopes, Ícaro Rodrigues, Dani Evelise, Bruno e Liliane Oliveira.

Aos africanos que com coragem atravessam o atlântico em busca de um Brasil dos sonhos e os sonhos no Brasil: Lenna Bahule, Inês Queme, Paulo Chavonga, Simon Ngao Mule, Leonel de Sousa, Otis Selimane e Vocal kuimba.

Aos amigos do projeto CAJU não consigo expressar a minha gratidão e aos Colegas do futebol das “quintas-feras”. Vocês estarão sempre em meu coração.

Aos Manhawas, Amocubas e malugelas. **Guimuthamale**

Meu muito obrigado, Thinabonga, Mai thabassa, Kanimambo

Aos Negros e Negras:

“Armem-se até aos dentes com a ciência e resgatem a vossa cultura”

Cheikh Anta Diop

The function of education is to teach one to think intensively and to think critically.

Martin Luther King Jr

Sobre reconhecer Embondeiros: "Os olhos leem o que no fundo, a alma reconhece"

Maitê Freitas

RESUMO

INLAMEA, O. F. **Mapeamento e distribuição de isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* proveniente de casos de tuberculose bovina em Moçambique.** [Mapping of the distribution of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains involved in bovine tuberculosis in Mozambique]. 2018. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A tuberculose bovina (bTB) é um problema sanitário importante em Moçambique e ainda a espera de uma ação organizada por parte dos Serviços Veterinários Oficiais. O presente estudo teve por objetivo investigar e mapear os genótipos de *Mycobacterium bovis* circulantes no país e paralelamente maximizar a utilização de abatedouros como fonte de informação epidemiológica da bTB. Durante o período de outubro de 2016 a abril de 2017 foram colhidas um total de 90 amostras de lesões sugestivas de tuberculose bovina nos abatedouros Municipais de Maputo e Maxixe e dois abatedouros privados da província de Maputo. Essas amostras, juntamente com outras 10, disponibilizadas pelo Laboratório Central de Veterinária e 72 do banco de amostras de Faculdade de Veterinária de Moçambique foram processadas para isolamento, identificação e discriminação molecular (MIRU-VNTR e *spoligotyping*) de micobactérias. Nos abatedouros foram coletados dados para calcular as prevalências de carcaças com lesões sugestivas de tuberculose e foi estimada em 0,63% e 80% das carcaças condenadas por tuberculose apresentaram lesões compatíveis com generalização da infecção. Foram obtidos 104 isolados identificados como gênero *Mycobacterium*, dos quais 80 foram compatíveis com o MTBC e 10 MNT. Destes 80 MTBC, 70 foram identificados como *M. bovis*. O MIRU-VNTR discriminou os 70 isolados de *M. bovis* em 47 perfis, agrupados em 3 complexos clonais e cinco *singletons*. Dos 24 loci estudados, os que apresentaram maiores polimorfismos foram MIRU 960, 2996 e QUB-4052. Em relação ao *spoligotyping*, foram identificados cinco perfis, dos quais o mais prevalente foi o SB0961, seguido do SB0140, SB2306, SB2481 (novo) e SB1099. Dos 70 isolados submetidos a análises dos complexos clonais africano 1, africano 2, europeu 1 e europeu 2, foram detectados apenas 18,5% de europeu. O distrito de Machanga foi o que apresentou maior diversidade de isolados e o Govuro maior número de isolados de *M. bovis*. Quando comparados as técnicas, o MIRU-VNTR apresentou maior poder de discriminação em relação ao *spoligotyping*. O complexo clonal

européu 1 está relacionado com o SB0140 que por sua vez é característico de isolados do Reino Unido e de países que tiveram trocas comerciais de bovinos com o país, incluindo os circunvizinhos a Moçambique e de onde há registros da importação de animais para Moçambique. A não identificação precisa dos complexos clonais dos *spoligotyping* SB0961, SB2306, SB2481 relacionados, podem ser derivados do BCG, que é sugestivo de evolução clonal própria de Moçambique e os complexos clonais até hoje existentes não são suficientes para discriminar os isolados de Moçambique. Embora os dados de abatedouros sugeriram que a prevalência da tuberculose bovina em Moçambique está entre as mais baixas dos países africanos, a predominância de carcaças com lesões generalizadas significa alto risco de exposição de animais e humanos, sobretudo das populações rurais que têm estreito contato com esses animais. Esse risco é ampliado em função da alta prevalência de humanos que vivem com HIV/AIDS no país. Assim, recomenda-se que Moçambique estruture programa de controle da doença nos animais e métodos de diagnóstico que detectem a infecção por *M. bovis* na população humana.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*. MIRU-VNTR. *Spoligotyping*. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Moçambique.

ABSTRACT

INLAMEA, O. F. **Mapping of the distribution of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains involved in bovine tuberculosis in Mozambique.** [Mapeamento e distribuição de isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* proveniente de casos de tuberculose bovina em Moçambique]. 2018. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Bovine tuberculosis (bTB) is a major sanitary problem in Mozambique and awaits organized action by the Official Veterinary Services. The aim of this work was to investigate and map the circulating *Mycobacterium bovis* genotypes in the country and to maximize the use of slaughterhouses as a source of epidemiological information for bTB. During the period from October 2016 to April 2017, a total of 90 samples with lesions suggestive of bovine tuberculosis were collected from Maputo and Maxixe Municipal abattoirs and two private abattoirs from the province of Maputo. These samples, together with 10 others provided by the Central Veterinary Laboratory and 72 from the Veterinary Faculty sample bank were processed for isolation, identification and molecular discrimination (MIRU-VNTR and spoligotyping) of mycobacteria. Samples collected in the slaughterhouses were analyzed by calculating the prevalence of carcasses with lesions suggestive of bTB, which was estimated at 0.63% and 80% of carcasses condemned for tuberculosis presented lesions compatible with generalized infection. A total of 104 isolates were identified as *M. bovis* as *Mycobacterium* genus were obtained, of which 80 were compatible with MTBC and 10 MNT. Of these 80 MTBC, 70 were identified as *M. bovis*. The MIRU-VNTR discriminated the 70 isolates of *M. bovis* in 47 profiles, grouped in 3 clonal complexes and 5 singletons. Of the 24 loci studied, the ones with the highest polymorphisms were MIRU 960, 2996 and QUB-4052. In relation to spoligotyping, five profiles were identified; SB0961 was the most prevalent, being SB0961, followed by SB0140, SB2306, SB2481 (new) and SB1099. Of the 70 isolates submitted to analyzes of the clonal complexes African 1, African 2, European 1 and European 2, only 18.5% of European complex were detected. Machanga district presented the greatest diversity of isolates, while Govuro district had largest number of isolates of *M. bovis*. The MIRU-VNTR presented greater power of discrimination in relation to spoligotyping. The European clonal complex 1 was related to SB0140 which in turn is characteristic of isolates from the United Kingdom and from countries that have had

commercial trade in cattle with UK including those surrounding Mozambique and where there are records of imports of animals for Mozambique. The precise identification of the clonal complexes of the SB0961, SB2306 and SB2481 related spoligotypings subject to the BCG derivatives, is suggestive of the clonal evolution of Mozambique and that the clonal complexes to date are not sufficient to discriminate against the isolates from Mozambique. Although data from slaughterhouses suggested that the prevalence of bovine tuberculosis in Mozambique is among the lowest in African countries, the predominance of carcasses with generalized lesions means a high risk of animal and human exposure, especially of rural populations that have close contact with these animals. This risk is amplified due to the high prevalence of people that living with HIV/AIDS in the country. Thus, it is recommended that Mozambique structure a disease control program in animals and diagnostic methods that detect *M. bovis* infection in the human population.

Keywords: *Mycobacterium bovis*. MIRU-VNTR. Spoligotyping. *Mycobacterium tuberculosis* complex. Mozambique.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia dos pulmões (A) e fígado (B) mostrando lesões granulomatosas maciças (tuberculosas) e caseosas de bovinos inspecionados nos abatedouros de Sul de Moçambique.....	56
Figura 2 - Aspectos morfológicos das colônias com crescimento sugestivo de gênero <i>Mycobacterium</i>	58
Figura 3 - Agrupamentos formados com base nos perfis de MIRU-VNTR	61
Figura 4 - Dendograma demonstrando árvore filogenética dos padrões de MIRU VNTR de <i>M. bovis</i>	62
Figura 5 - Frequência dos padrões de <i>spoligotyping</i> identificados	63
Figura 6 - Mapeamento e distribuição dos perfis de <i>spoligotyping</i> dos isolados ..	64
Figura 7 - Dendograma comparando os resultados das análises com as técnicas de MIRU-VNTR e <i>spoligotyping</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Importância da pecuária no rendimento dos agregados (643) detentores de bovinos.....	53
Tabela 2 - Prevalência de lesões sugestivas de bTB no abatedouros da Machava e municipal de Maputo	54
Tabela 3 - Localização das lesões sugestivas de bTB nos abatedouros da Machava e municipal de Maputo	55
Tabela 4 - Número de amostras com lesões sugestivas de bTB obtidas em todos abatedouros	57
Tabela 5 - Frequências das espécies de MNT isoladas nas lesões sugestivas de bTB	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de amostras com lesões sugestivas de bTB coletadas no abatedouro municipal de Maputo e a positividade na cultura e os distritos originários.....	56
Gráfico 2 - Frequência de amostras com lesões sugestivas de bTB coletadas no abatedouro da Machava e a positividade na cultura e os distritos originários	57
Gráfico 3 - Frequência de cultura positiva em relação a total de amostras de acordo com as províncias de origem.....	59
Gráfico 4 - Frequência dos isolados de MTBC de acordo com a origem.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Primers usados no TB multiplex PCR e tamanho esperado para identificação do gênero <i>Mycobacterium</i> e complexos MTBC e MAI, São Paulo, 2016-2018.....	46
Quadro 2 - Primers usados na diferenciação dos membros do MTBC e o tamanho esperado, São Paulo, 2016-2018.....	47
Quadro 3 - Ciclos de PCR para a identificação de complexos clonais, São Paulo, 2016-2018.....	51
Quadro 4 - Primers e tamanho de fragmento esperado para diferentes complexos clonais, São Paulo, 2017.....	52

LISTA DE SÍMBOLOS ABREVIATURAS

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente
BCG – Bacilo de Calmette-Guérin
bTB- tuberculose bovina
CRISPR - *clustered regularly interspaced palindromic repeats*
CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio
DCA- Direção de Ciências animais
DNA- *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
DR - Repetições diretas
FACVET- Faculdade de Veterinária
HIV- Vírus de imunodeficiência humana
HPC - cloreto de hexadecilpiridínio
LCV- Laboratório Central de Veterinária
MAC- Complexo *Mycobacterium avium*
MIRU - Unidades Repetitivas Micobacterianas (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*)
MNT- Micobactérias não tuberculosas
MOTT- *Mycobacteria other than tuberculosis*
MTBC - complexo *Mycobacterium tuberculosis*
MTC- Complexo *Mycobacterium terrae*
NaCl - cloreto de sódio
OMS – Organização Mundial de Saúde
OIE - *World Organization for Animal Health*
pb - pares de base
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PNCEBT - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal
RDs - regiões de diferença
rRNA - ácido ribonucleico ribossomal
SCITT - Single Intradermal Comparative Tuberculin Test
SIDA – Síndrome de imunodeficiência adquirida
SNPs - polimorfismos de nucleotídeo único
TB- tuberculose
UEM- Univesidade Eduardo Mondlane
USP - Universidade de São Paulo
VNTR - *Variable Number Tandem Repeat*
VPS - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

% - percentagem

°C - Graus centígrados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 SISTEMAS PRODUTIVOS DE BOVINOS NA ÁFRICA SUBSAARIANA E SEUS DESAFIOS	23
2.2 O GÊNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	25
2.2.1 Micobactérias não tuberculosas	25
2.2.2 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
2.3 TUBERCULOSE BOVINA	30
2.4 TUBERCULOSE BOVINA EM MOÇAMBIQUE PASSADO, PRESENTE E FUTURO	33
2.5 TUBERCULOSE ZONÓTICA: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR	34
2.6 TUBERCULOSE HUMANA EM MOÇAMBIQUE: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA	35
2.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS DA TUBERCULOSE BOVINA	37
2.7.1 <i>Spoligotyping</i>	38
2.7.2 MIRU -VNTR	39
2.7.3 Complexos clonais	39
3. Objetivos	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 ÁREA DE ESTUDO	41
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA PRODUTIVO DE BOVINOS	42
4.3 PREVALÊNCIA DE LESÕES SUGESTIVAS DE BTB NOS ABATEDOUROS	42
4.4 COLETA DE AMOSTRAS	43
3.5 CULTURA E ISOLAMENTO BACTERIANO	43
4.6 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO	44
4.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MEMBROS DO MTBC	45
4.7.1 TB <i>Multiplex</i> PCR	45
4.7.2 RD <i>Multiplex</i> PCR	46
4.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS MNT	47
4.8.1 PCR de Restrição enzimática	47
4.9 TIPAGEM MOLECULAR DOS MEMBROS DE MTBC	48
4.9.1 Genotipagem pelo método de <i>spoligotyping</i>	48
4.9.2 Genotipagem pelo método de MIRU- VNTR	50
4.9.3 RD complexo clonal PCR	50
4.10 ELETROFORESE	52
5 RESULTADOS	53
5.1 CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA PRODUTIVO DE BOVINOS EM MOÇAMBIQUE	53

5.2 PREVALÊNCIA DA TUBERCULOSE BOVINA NOS ABATEDOUROS DE MAPUTO	54
5.3 CULTURA E ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA.....	57
5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS.....	59
5.5 DIVERSIDADE MOLECULAR DO MTBC ISOLADOS DE BOVINOS EM MOÇAMBIQUE	60
5.5.1 Tipagem molecular por MIRU-VNTR	61
5.5.2 Tipagem molecular por <i>spoligotyping</i>	63
5.5.3 Comparação de MIRU-VNTR e <i>Spoligotyping</i>	65
5.6 ANÁLISES DE COMPLEXOS CLONAIIS RD.....	66
5.7 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS.....	66
6 DISCUSSÃO	67
6.1 CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS PRODUTIVOS DE BOVINOS NO SUL DE MOÇAMBIQUE.....	67
6.2 PREVALÊNCIA DA TUBERCULOSE BOVINA NOS ABATEDOUROS DE MAPUTO	68
6.3 CULTURA E ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA.....	70
6.4 TIPAGEM MOLECULAR POR MIRU-VNTR	70
6.5 TIPAGEM MOLECULAR POR <i>SPOLIGOTYPING</i>	72
6.6 COMPARAÇÃO DE DISCRIMINAÇÃO DE ISOLADOS DE MTBC POR MIRU-VNTR E <i>SPOLIGOTYPING</i>	75
6.7 COMPLEXO CLONAL DAS ESTIRPES DE <i>M. BOVIS</i>	75
6.8 IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS.....	77
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICES.....	104

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (bTB) é doença infectocontagiosa progressiva, causada por *Mycobacterium bovis*, pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que afeta os bovinos, outros animais domésticos e selvagens, além dos humanos (HIRSH; BIBERSTEIN, 2004; COETZER; THOMSON; TUSTIN, 2005). Em Moçambique, a bTB é uma doença prevalente, sem identificação de área livre (MUCAVELE, 2008; MACUCULE, 2009). Embora se saiba pouco sobre a prevalência da bTB no país, estudos mostraram que a distribuição não é uniforme, com zonas de baixa e alta prevalência, variando de 0,98% a 39,6% de animais reagentes (MOIANE et al., 2014; TANNER et al., 2014; MACHADO, 2015). Pressupõe-se que a bTB seja importante causa das perdas econômicas na produção de bovinos, evidenciadas pelas rejeições de carcaças nos abatedouros e limitações do comércio interno e externo dos países (MACUCULE, 2009).

Em Moçambique, o programa de controle da bTB tem como princípio o teste de tuberculinização e o abate dos animais reagentes em abatedouros, todavia, estas medidas não são adotadas de forma consistente e sistemática, e não se aplicam o setor familiar (MUCAVELE, 2008; MOIANE et al., 2014). A pasteurização/fervura do leite, uma das medidas eficazes para prevenção da transmissão da zoonótica da bTB também não é utilizada de forma consistente em Moçambique (MUCAVELE, 2008) e o potencial de transmissão zoonótica é exacerbado pela convivência direta entre as famílias criadoras/pastores e os bovinos (MOIANE et al., 2014).

Pouco se sabe, até o momento, sobre o impacto da bTB em humanos em Moçambique. Há dois estudos realizados que não foi evidenciado o envolvimento da bTB na saúde humana (MUCAVELE, 2008; VIEGAS et al., 2010). No entanto, ambos tiveram duas limitações importantes: (1) o fato de as amostras terem sido provenientes de populações sem contato direto com animais infectados (2), foram investigados somente casos de tuberculose pulmonar. Posteriormente, uma de sete amostras de linfadenite tuberculosa de humanos no distrito de Govuro (que possui a prevalência mais alta até hoje identificada em bovinos), resultou num isolado identificado como *M. bovis*, apresentando o padrão *spoligotyping* SB0961 (VIEGAS, 2015), o mesmo identificado em isolados provenientes de bovinos do mesmo distrito por Machado (2018).

Estudos desta natureza só são possíveis utilizando técnicas de biologia molecular como complementares ao diagnóstico de campo (a prova tuberculínica) e laboratorial (histopatologia e cultura) usados na vigilância epidemiológica em matadouros e outras fontes de amostras *post mortem*. São elementos que devem ser empregados como critério e de modo adequado a cada situação epidemiológica (OIE, 2009).

O cultivo microbiológico é o único método considerado *gold standard* para obter o diagnóstico definitivo da tuberculose bovina e serve por vezes, como base para aplicação de técnicas moleculares (THOEN, 1990; GORMLEY et al., 2014). A tipificação bioquímica de *M. bovis* como prova confirmatória é um processo laborioso, que requer entre 3 a 6 semanas para obtenção de resultados e, dada a peculiaridade deste grupo bacteriano, nem sempre é possível distinguir entre os membros do MTBC, o que pode limitar o diagnóstico (DUARTE et al., 2007).

Técnicas de genotipagem são muito úteis para analisar aspectos epidemiológicos como dinâmica da população, distinguir as especificidades geográfica entre vários isolados, a relação com uma determinada população e região geográfica, e identificar meios de transmissão da doença (VAN SOOLINGEN et al., 1991; ACEVEDO et al., 2013; HLOKWE; VAN HELDEN; MICHEL, 2013; MWAKAPUJA et al., 2013). Os métodos de genotipagem mais comuns recorrem à amplificação por PCR de regiões do genoma suficientemente estáveis para servirem de marcador epidemiológico, mas com potencial polimorfismo para diferenciar estirpes sem relação epidemiológica entre si. No caso dos membros do MTBC, estas técnicas incluem o *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*) e a análise de MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeats*) (DUARTE et al., 2007).

O *Spoligotyping* é uma das técnicas moleculares baseada na utilização do PCR para amplificação do DNA presente no locus DR (*direct repeat*), diferenciando os isolados do MTBC, principalmente em amostras com poucas cópias de IS6110 como é o caso de *M. bovis* (ARANAZ et al., 1996; COUSINS et al., 1998; ROCHA et al., 2013).

O MIRU-VNTR é um método de genotipagem baseado na amplificação por PCR que utiliza iniciadores específicos das regiões flangeadoras de múltiplos loci para a determinação do número de cópias dos MIRU-VNTR pela análise do tamanho dos produtos de amplificação (SUPPLY et al., 2001). Novos iniciadores são

continuamente criados com melhor poder discriminatório para *M. bovis* (HLOKWE; VAN HELDEN; MICHEL, 2013), requerendo padronização para possibilitar a comparação entre estudos realizados por diferentes autores.

Machado et al (2018), em estudo realizado em Moçambique com técnicas moleculares de diagnóstico de micobactérias, identificou a predominância do perfil SB0961 em isolados provenientes de casos de bTB em bovinos de várias províncias do país seguido do perfil SB0140. O perfil SB0140 característico de isolados do Reino Unido e de países que tiveram comércio de bovinos com o Reino Unido foi identificado exclusivamente em isolados oriundos do sul de Moçambique e a maioria das unidades de produção comercial. Com a técnica MIRU-VNTR foi possível discriminar diferentes padrões dentro do mesmo padrão *spoligotyping*. Alguns iniciadores não evidenciaram variabilidade em todos os isolados identificados e foi concluído que depois de investigação mais extensa poderão ser considerados como necessários ou não na análise de isolados de Moçambique (MACHADO et al., 2018). Esse conhecimento torna aprofundado sobre epidemiologia molecular, só se torna relevante quando se conhece as particularidades da pecuária de cada região. A distribuição e epidemiologia da bTB varia de acordo com o sistema de produção. No entanto, a importância na saúde pública e o controle requer atenção de todos produtores, independente do sistema de produção (AKALU, 2017).

A importância do conhecimento do padrão genético dos agentes causadores da bTB já foi amplamente abordada acima. Até agora apenas um estudo foi realizado para avaliação destes padrões. No estudo anteriormente realizado a maior parte dos isolados foram colhidos baseados na tuberculinização reagentes através, acarretando custos elevados. Porém, os abatedouros são locais para onde convergem animais de diferentes regiões do país, constituindo importante fonte de informação epidemiológica de doenças, apesar de subutilizada. A utilização desta fonte de amostras pode aumentar o acervo de isolados provenientes de casos de bTB visando a melhorar o conhecimento sobre o padrão genético das estirpes que ocorrem em Moçambique com intuito de investigar a epidemiologia da doença no País e o papel que a doença desempenha no sistema de produção de bovinos em Moçambique.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMAS PRODUTIVOS DE BOVINOS NA ÁFRICA SUBSAARIANA E SEUS DESAFIOS

A pecuária desempenha papel importante na vida dos povos em todo o mundo, desde comunidades rurais remotas até grandes cidades modernas. Fornece proteína de alta qualidade proveniente de carne e leite, além de lã e couro, e força de tração para atividades agrícolas (JAHNKE, 1982; WHO; FAO; OIE, 2017). Os sistemas produtivos, na maioria dos países africanos, compreendem a pequena e a grande escala. A produção ou sistema de grande escala é relativamente novo na África. Foi introduzida no século passado e até hoje representa proporção relativamente pequena da produção na África subsaariana. Grande parte da produção de bovinos ocorre no sistema tradicional de pequena escala em muitos países africanos (FAO, 1985). Apesar dos sistemas produtivos serem definidos por características geográficas, manejo e função, bem como espécies envolvidas, em geral, a abordagem é flexível e envolve uma interação entre eles. Por exemplo, para os sistemas pastoris, as funções sociais e culturais ligadas a função de subsistência e o papel da posse das terras comunais são mais importantes, enquanto que para o sistema agropecuário, o papel da pecuária é maximizar o lucro sob crescente pressão populacional, pastoreio contratual para além da gestão (JAHNKE, 1982). Estes sistemas são centrais para as estratégias de sobrevivência das famílias pobres, podem servir como repositório da riqueza de uma família e são comercializados como uma fonte emergencial de capital. Em alguns contextos, a posse de gado está ligada ao status social e pode ter significado cerimonial, cultural e religioso (WHO; FAO; OIE, 2017).

Os sistemas pastoris evoluíram com práticas como a mobilidade do rebanho de bovino, variando o tamanho dos rebanhos e a troca de animais como mecanismos adaptativos para o gerenciamento da variabilidade e incerteza dos recursos especialmente alimentícios (ORTIZ-PELAEZ et al., 2006; DEJENE, 2017).

O desenvolvimento da pecuária na África não só envolve a criação de animais, especialmente bovinos, mas também os serviços veterinários. Estes dois setores são sujeitos a desafios e parecem que são inúmeras as restrições que

impedem a eficácia dos mesmos e incluem o controle de doenças e aumento da produção (ANTENEH, 1989). No sistema pastoril de mobilidade apesar de fornecer vantagens adaptativas, trocas de animais, tamanhos de rebanhos ou propriedades foram recentemente apontadas como fatores de riscos para a transmissão de doenças zoonóticas devido a facilidade de contato com animais infectados (INANGOLET et al., 2008; MUNYEME et al., 2008; KATALE et al., 2013). Com as mudanças climáticas, ocorre diminuição das áreas de pastagens e, conseqüentemente, menos pastos para a alimentação animal. A sensibilidade ao clima, no entanto, varia de acordo com o tamanho da propriedade ou sistema de produção. Um estudo demonstrou que a receita líquida adquirida em um sistema de produção pecuária na África é altamente sensível ao clima. As grandes unidades normalmente são mais prejudicadas por temperaturas mais altas do que as menores. Por conseguinte, as pequenas propriedades são resilientes podendo alternar a criação de animais com as culturas agrícola tolerantes ao calor entre a criação de animais (SEO; MENDELSON, 2007).

Os desafios dos sistemas produtivos também estão ligados a educação veterinária. A formação veterinária na África durante muitos anos centrou-se para atender às necessidades do setor pecuário e a maioria dos veterinários foram empregados pelo Estado. No entanto, em várias regiões os criadores possuem raças locais que normalmente apresentam baixa produtividade e os problemas sanitários constituem principais restrições à produtividade desses animais. Na África existem 46 escolas de veterinária, das quais 21 delas estão localizadas na África subsaariana e África do Sul, com maior número de escolas (SWAN; KRIEK, 2009).

O crescimento populacional na África tem gerado o uso de cada vez maior de terras marginais por sociedades pastoris e produtores de grande escala. Essas terras correspondem a áreas remanescentes de vida selvagem, criando uma pressão para utilização dessas áreas que, em maioria, servem de parques nacionais. Portanto, pode-se observar aumento do contato entre os sistemas de produção pecuária e ecossistemas selvagens, levando ao potencial para transmissão de patógenos nos dois sentidos (ETTER et al., 2006). Nos últimos anos há crescente reconhecimento da importância de interação de múltiplas espécies para o surgimento e reemergência de patógenos em animais selvagens, bovinos e humanos (CLEAVELAND; LAURENSEN; TAYLOR, 2001). Para Osofsky et al. (2005) a ausência de políticas formais sobre o controle de doenças dos animais em

áreas de conservação pode ter um impacto negativo na saúde pública, agricultura, comércio e mesmo em conservação. A relação próxima dos humanos com os animais pode representar riscos à saúde pública. As rotas mais comuns de transmissão de doenças zoonóticas para as pessoas são através do contato direto com um animal infectado ou do consumo de alimentos de origem animal não seguros (WHO; FAO; OIE, 2017). Nos diferentes sistemas de produção a epidemiologia da bTB não é uniforme. No Entanto, considerados todos aspectos relacionados com a importância da doença, o controle requer atenção de todos produtores, independente do sistema de produção (AKALU, 2017).

2.2 O GÊNERO *MYCOBACTERIUM*

O gênero *Mycobacterium* é constituído por bactérias com forma de bastonetes ou bacilos finos, álcool-ácidas resistentes, imóveis, não esporuladas, aeróbias geralmente de vida livre ou patógenos de vertebrados (FALKINHAM III, 1996). O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), *M. leprae*, potencialmente patogênicas (complexo *M. avium*) e micobactérias não tuberculosas (MNT) também conhecidas por micobactérias atípicas ou ambientais que incluem vários complexos (FALKINHAM III, 1996; VAN SOOLINGEN, 2001; BIET et al., 2005, BOLAÑOS et al., 2018).

As micobactérias possuem na sua parede celular grande quantidade de ácidos micólicos e outros lípidos complexos que na coloração de Ziehl-Neelsen resistem à descoloração por álcool-ácido, bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) sua propriedade mais característica. As espécies do gênero *Mycobacterium* podem ser confundidas com outros gêneros relacionados (*Corynebacterium*., *Nocardia* ou *Rhodococcus*) devido às características fenotípicas que são semelhantes (CORNER, 1994).

2.2.1 Micobactérias não tuberculosas

As micobactérias não tuberculosas (MNT), são bactérias que se encontram no meio ambiente geralmente como saprófitas, comensais e simbiontes no ecossistema. São também conhecidas como micobactérias não tuberculosa (MOTT) ou micobactérias ambientais (COVERT et al., 1999; GCEBE et al., 2013; GCEBE;

HLOKWE, 2017). Existem mais de 180 membros do gênero *Mycobacterium* que diferem na patogenicidade, adaptação ao hospedeiro, virulência, resposta a drogas e características de crescimento. Se considera MNT micobactérias diferentes do MTBC e *M. lepra* (GOPINATH; SINGH, 2010).

As MNT representam um grupo diverso de micobactérias. Não são consiradas somente patógenos emergentes em oportunistas de humanos e animais mas, do ponto de vista veterinário, algumas espécies induzem respostas imunes de reação cruzada que dificultam o diagnóstico de bTB (CAYROU et al., 2010; SCHILLER et al., 2010; MICHEL et al., 2011; GCEBE et al., 2013; GCEBE; HLOKWE, 2017). Considerando o aspecto de saúde humana, interferem com a eficácia da vacina BCG e resposta imune à tuberculose (BRANDT et al., 2002; WEIR et al., 2006). Ainda, têm sidos reportados isolados resistentes aos antimicrobianos indicados no tratamento humano (HORSBURGH; SELIK, 1989; FALKINHAM III, 1996; GOPINATH; SINGH, 2010).

Apesar de ter uma distribuição mundial, durante muito tempo as MNT foram negligenciadas. Atualmente foram identificadas mais de 150 espécies e encontram-se descritas em banco de dados (<http://www.bacterio.net>) (MARTÍN-CASABONA et al., 2004; VAN INGEN et al., 2009; BOTHA; GEY VAN PITTIUS; VAN HELDEN, 2013). O isolamento das espécies está em constante mudança na maioria das áreas geográficas e novas espécies estão emergindo devido ao aprimoramento de técnicas de diagnóstico para identificar MNT (MARTÍN-CASABONA et al., 2004; GCEBE; HLOKWE, 2017). Atualmente, cerca de um terço das MNT têm sido implicadas em doenças em humanos (BOTHA; GEY VAN PITTIUS; VAN HELDEN, 2013). Embora alguns fatores genéticos predispõem à infecção por MNT, nenhuma associação foi comprovada entre a doença e fatores geográficos, ocupacionais ou étnicos e infecções (GOPINATH; SINGH, 2010).

Com surgimento da epidemia de HIV/AIDS, as infecções por MNT têm mostrado alta prevalência representando novo desafio para os serviços de saúde (HORSBURGH; SELIK, 1989; FALKINHAM III, 1996; MARTÍN-CASABONA et al., 2004).

Segundo Gopinath e Singh (2010), as MNT continuam sendo sub diagnosticadas por médicos e microbiologistas, aliado a falta de infraestrutura laboratorial para cultura e identificação de MNT e, ao nível político, o alto fardo da TB e do HIV/AIDS atraírem a maior parte da atenção do sistema de saúde.

Na pecuária, as MNT têm uma importância pouco estudada. Sabe-se que infectam animais domésticos e selvagens como agentes patogênicos oportunistas causando micobacterioses e lesões semelhantes a tuberculose bovina (FALKINHAM III, 1996; GCEBE et al., 2013; GCEBE; HLOKWE, 2017). Ainda, certas espécies de MNT têm potencial para interferir na resposta imune gerando reações cruzadas que dificultam os testes de diagnóstico imunológico de bTB como o teste tuberculínico intradérmico em animais domésticos e selvagens (SCHILLER et al., 2010; MICHEL et al., 2011; GCEBE et al., 2013; GCEBE; HLOKWE, 2017).

Por uma questão de logística e facilidade de aquisição de amostras há mais relatos de MNT de animais abatidos do que isolados de animais selvagens na África (KAZWALA et al., 1998; GCEBE; HLOKWE, 2017).

O consumo de leite cru na África é uma prática bastante comum e, segundo Bolaños et al. (2018), a alta ocorrência de MNT nas amostras de leite representa preocupação de saúde pública em alguns países, como o Brasil, permanece o consumo de leite.

O complexo *Mycobacterium terrae* (MTC) é um grupo das MNT de crescimento lento e geneticamente próximas. Por conseguinte, apresentam um grau de complexidade elevado para a sua diferenciação fenotípica e molecular convencional. O MTC inclui as espécies *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. hiberniae*, *M. kumamotonense*, *M. arupense*, *M. senuense*, *M. paraterrae*, *M. engbaekii*, *M. longobardum* e *M. heraklionense* (NGEOW et al., 2015).

A proximidade dos membros dos MTC e MTBC pressupõem que bactérias sujeitas às mesmas pressões ambientais em um habitat complexo, podem evoluir para diferentes espécies sem perder suas assinaturas genéticas (NGEOW et al., 2015).

Os membros de MTC tem pouco significado clínico, embora tenham sido isoladas, ocasionalmente, de hospedeiros animais e pacientes humanos. No entanto, em humanos, foram relatadas infecções crônicas e debilitantes e a resistência múltipla aos antibióticos contribuiu para os problemas terapêuticos causadas por infecções de MNT (TASLER; HARTLEY, 1981; SMITH D. S et al., 2000; ZHANG et al., 2013).

Os membros do complexo *Mycobacterium avium* (MAC), ou micobactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos, são MNT capazes de causar amplo espectro de doença clínica, especialmente em pacientes

imunocomprometidos (GRIFFITH et al., 2007). Porém, a epidemiologia única dessas infecções oportunistas não é totalmente compreendida, em parte devido à falta de método de genotipagem aplicável a todas as espécies do complexo (CAYROU et al., 2010). Com o surgimento de HIV/AIDS, o MAC é causa comum de infecção por Micobactérias em pacientes com AIDS, onde *M. avium* é isolado em mais de 95% dos pacientes que desenvolvem infecções. Em hospedeiros imunocompetentes, a doença pulmonar causada por MAC raramente ocorre e, nestes casos, *M. intracellulare* é responsável por 40% dessas infecções (GRIFFITH et al., 2007).

Na pecuária, o MAC possui grande diversidade de hospedeiros, causando tuberculose aviária ou micobacteriose aviária em pássaros e mamíferos selvagens, animais domésticos e de cativeiro. O MAC tem sido descrito como causa de lesões tuberculosas em bovinos abatidos em abatedouros (DIGUIMBAYE-DJAIBÉ et al., 2006). Em ruminantes, a paratuberculose ou doença de Johne representa grande questão global de saúde animal (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2008). Estudos na Europa sugerem que o uso de vacinação diminui a incidência consideravelmente de produção de leite e a vida útil das vacas leiteiras nas fazendas infectadas (JUSTE et al., 2009; BASTIDA; JUSTE, 2011).

2.2.2 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

As espécies pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) são filogeneticamente relacionadas e possuem mais de 99,9% de similaridade na sequência de nucleotídeos e do gene 16s rRNA (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002; GARNIER et al., 2003). Os membros do complexo diferem amplamente em termos de tropismo pelo hospedeiro, fenótipo e patogenicidade que podem induzir (BROSCH et al., 2002; HUARD et al., 2003; AYELE et al., 2004; SMITH et al., 2006a; OIE, 2009).

Até a data, são considerados membros do MTBC, *M. tuberculosis* (e as suas linhagens), *M. africanum* que têm os humanos como seus hospedeiros naturais e são chamadas de *M. tuberculosis sensu stricto*. *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. suricattae*, *M. mungi*, “dassie bacillus” e “chimpanzee bacillus” geralmente possuem animais como seus hospedeiros naturais. A nomenclatura de algumas espécies de micobactérias do MTBC foi de acordo com o

primeiro animal de onde foram isoladas, porém, a capacidade de infectar não se limita ao hospedeiro de isolamento inicial (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014).

Os membros do MTBC possuem evolução clonal, ou seja, são originárias de um ancestral comum e não há evidências sólidas de transferência horizontal de genes, podendo se assumir que não ocorre, esta última característica que levou a retirada de *M. cannetti* do complexo (SUPPLY et al., 2003; SMITH et al., 2006a; DOS VULTOS et al., 2008; GALAGAN, 2014).

Embora as espécies do MTBC sejam altamente similares entre si em nível do DNA, a divisão em diferentes espécies é baseada na preferência do hospedeiro, apoiado por filogenética molecular (BROSCH et al., 2002). Contudo, dada a estreita relação filogenética entre estas linhagens e espécies, tem sido sugerido que podem ser consideradas como ecótipos dentro do MTBC (SMITH et al., 2006b; GAGNEUX, 2018). Além disso, o conjunto de hospedeiros de alguns desses ecótipos permanece mal definido, em parte devido ao baixo número de isolados que foram estudados até à data (GAGNEUX, 2018).

Estudos comparativos têm sido realizados de modo a compreender os fatores de virulências no MTBC, atualmente, se entende que muitos fatores também estão presentes nas MNT não patogênicas e, por vezes, varia apenas em número de fatores de virulência (BRENNAN; DELOGU, 2002; GEY VAN PITTIUS et al., 2006; WANG et al., 2015). Apenas o conjunto das proteínas PE_PGRS parece ser exclusivo das MTBC (BRENNAN; DELOGU, 2002; GEY VAN PITTIUS et al., 2006).

O MTBC destaca-se entre a maioria das outras bactérias por abrigar número desproporcionalmente alto de genes do sistema de toxina-antitoxina envolvidos em várias funções incluindo na regulação gênica (SALA; BORDES; GENEVAUX, 2014; WANG et al., 2015). No entanto, acredita-se que não exista característica genômica única que possa explicar a virulência e o potencial de transmissão do MTBC, embora, as interações epistáticas entre muitos loci genômicos e sua regulação transcricional coordenada parecem estar envolvidos (GAGNEUX, 2018). Da mesma forma, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que determinam o alcance do hospedeiro no MTBC.

Uma característica marcante para a adaptabilidade dos MTBC a diferentes hospedeiros é a deleção da região de diferença 1 do genoma (RD1). A RD1 codifica o sistema de secreção ESX1 e é necessária para virulência de *M. tuberculosis sensu stricto*. A deleção de RD1 e a perda de virulência, poderia ter contribuído para a

adaptação de *M. microti*, *M. mungi* e *dassie bacillus*, uma vez que estas bactérias infectam principalmente espécies hospedeiras que vivem em ambientes lotados com baixa ventilação, onde o potencial para transmissão é alto.

Gonzalo-Asensio e et al, (2014), descreveram que a mutação no sistema de regulação dos componentes do PhoPR está relacionada com a perda de virulência, em humanos das espécies adaptadas a animais. No entanto, essas diferenças fenotípicas contribuem para a baixa adaptação de *M. bovis* em humanos que ainda não está clara (GAGNEUX, 2018). Em infecções experimentais de *M. tuberculosis sensu stricto* em bovinos demonstraram que *M. tuberculosis* é altamente atenuado em comparação com *M. bovis*, o que é consistente com a natureza esporádica da transmissão zoonótica ver,ersa de *M. tuberculosis sensu stricto* a animais, mas a base molecular para a preferência deste hospedeiro permanece desconhecida bem como a interação e o caráter zoonótico da bTB (AMENI et al., 2013; GAGNEUX, 2018).

A identificação e diferenciação laboratorial das espécies dentro do complexo, baseando-se principalmente na análise de características fenotípicas como coloração de Ziehl-Neelsen, morfologia das colônias, taxa de crescimento e testes bioquímicos, é laboriosa e demorada. Por outro lado, devido ao elevado grau de similaridade, as regiões de diferenciação RD são amplamente utilizadas para diferenciar esses membros, de acordo com os padrões de presença e ausência dos RDs (Warren et al., 2006). Os métodos de genotipagem tornaram os estudos epidemiológicos e a discriminação rápida das espécies mais promissoras, ampliando a compreensão das relações filogenéticas e a origem evolutiva dos membros do complexo *M. tuberculosis* (VIEGAS, 2015).

2.3 TUBERCULOSE BOVINA

A bTB caracteriza-se pelo desenvolvimento progressivo de lesões nodulares denominadas tubérculos, que podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido (COETZER; THOMSON; TUSTIN, 2005).

A bTB é uma doença de grande importância socioeconômica afetando a produção pecuária, a vida selvagem, o comércio internacional e a saúde pública. Na pecuária há uma redução da produtividade, com prejuízos de 10 a 25% na produção leiteira, descarte precoce dos animais, redução de crescimento, baixa condição

corporal, eliminação de animais de alto valor zootécnico, morte de animais, reprovação de carcaças no abate (LAGE et al., 2006; MUNYEME et al., 2010; KATALE et al., 2013), e embargos no comércio internacional de produtos animais (MEDEIROS et al., 2010). Na vida selvagem, a infecção por *M. bovis* tem sido detectada em várias espécies selvagens incluindo as espécies ameaçadas de extinção podendo causar consequências graves ao ecossistema com reflexos negativos na conservação e turismo (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010). Na saúde pública, a doença tem potencial zoonótico, constituindo perigo para a saúde pública, especialmente em países sem medidas efetivas de controle da tuberculose bovina (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010).

Em geral, os membros do MTBC são caracterizados por baixa especificidade ao hospedeiro e, particularmente *M. bovis*, agente causal da bTB, possui uma das maiores variedades de hospedeiros entre os agentes patogênicos conhecidos (BROSCH et al., 2002). Esta característica de *M. bovis* contribui para a visão de que o controle da tuberculose em bovinos não será alcançado se os reservatórios selvagens não forem incluídos na dinâmica da doença (O'REILLY; DABORN, 1995).

Os animais selvagens que servem como reservatórios da bTB, constituem risco potencial para a infecção de animais domésticos nas áreas onde existe contato entre as espécies (COSIVI et al., 1995, COSIVI et al. 1998). Diferentes espécies não são igualmente susceptíveis à doença e a manunção em área específica envolvem interações epidemiológicas entre animais domésticos, fauna selvagem e humanos (MUCAVELE, 2008; OIE, 2009).

A infecção pode ocorrer pela ingestão de leite ou pasto contaminado e causa lesões nos linfonodos mesentéricos e por via respiratória com envolvimento dos pulmões e linfonodos associados com possível disseminação para outros órgãos (THOEN, 1990). O frequente envolvimento dos pulmões e dos linfonodos associados indicam que a via respiratória é a mais importante no processo de transmissão (CORNER, 1994).

A introdução de um animal infectado numa região livre ou contato com rebanho infectado constituem fontes de infecção, e o movimento descontrolado de animais infectados facilita a disseminação da bTB (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994; BROOKS-POLLOCK; KEELING, 2009; SKUCE; ALLEN; MCDOWELL, 2012). A transmissão entre animais é, principalmente, aerógena, pelo contato próximo entre animais por via aerossóis, partilha de alimentos entre animais infectados e não

infectados são os principais fatores de risco para a transmissão de bTB. Por sua vez, animais criados em áreas livres apresentaram menor risco em relação aos confinados (CLEAVELAND; LAURENSEN; TAYLOR, 2001; AMENI; ERKIHUN, 2007).

Na África subsaariana, os animais domésticos, selvagens e os humanos compartilham os mesmos pontos de água, especialmente na época seca, que são um potencial para aumentar a transmissão e a disseminação da bTB (AYELE et al., 2004; AMENI et al., 2013). No entanto, o status da transmissão em comunidades de múltiplos hospedeiros foi documentada em poucos países africanos (RENEWICK; WHITE; BENGIS, 2007; DE GARINE-WICHATITSKY et al., 2013). Apesar de uma ampla distribuição e prevalência alta em animais selvagens e domésticos, os fatores de risco para a transmissão não são bem conhecidos nos países em desenvolvimento, posto que a maioria dos estudos são realizados em países desenvolvidos onde as práticas agrícolas são mais intensivas e os programas de controle e erradicação foram implementados há vários anos, em contraste aos países africanos, com o agravante de múltiplas espécies hospedeiras (DEJENE et al., 2016; DEJENE, 2017).

Na maioria dos países desenvolvidos os programas de controle praticamente eliminaram a bTB de animais domésticos, sendo um problema nos países em desenvolvimento, principalmente na maioria dos países africanos (AYELE et al., 2004; SHITAYE et al., 2006; RENEWICK; WHITE; BENGIS, 2007; BOUKARY et al., 2011). Na África, estima-se que 85% dos bovinos e 82% da população humana vivem em áreas onde a bTB é prevalente (COSIVI et al., 1999), e as medidas de controle são inexistentes ou inadequadas (COSIVI et al., 1999; MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010). O desenvolvimento de um programa de controle da bTB em animais domésticos requer conhecimento profundo da epidemiologia da doença, inclusive nos animais selvagens, que podem atuar como reservatórios (DREWE et al., 2009). Por esta razão, em muitos países o sucesso nos programas de controle da bTB envolveu a compreensão da epidemiologia, amostragem de populações de animais selvagens, aplicação testes diagnósticos em bovinos e a capacidade de mapear genótipos de *M. bovis* com interação dinâmica entre o ambiente, o agente e o hospedeiro (RYAN et al., 2006).

2.4 TUBERCULOSE BOVINA EM MOÇAMBIQUE PASSADO, PRESENTE E FUTURO

A tuberculose bovina é uma doença prevalente em Moçambique. Não se conhece a origem da tuberculose bovina em Moçambique, mas acredita-se que a introdução de raças importadas pode ter sido a principal fonte da introdução da doença, principalmente na região sul (MACHADO, 2015).

A criação dos serviços veterinários em Moçambique é do início do século passado (MENDES, 2004). Embora já houvesse relatos de doenças bacterianas, incluindo a tuberculose bovina, esses sempre tiveram caráter organizacional desenhado para as doenças transmitidas por vetores. Tal pressuposto serve e serviu de entrave para o controle da bTB nos atuais serviços de veterinária. Segundo Machado (2015), a ocorrência da tuberculose bovina foi reportada apenas em 1940 resultante da inspeção *post mortem* de carnes. Assim os abatedouros são uma importante fonte de informação epidemiológica com a possibilidade de encontrar casos de bTB.

Não se conhece estimativas da prevalência da tuberculose bovina em Moçambique (MOIANE et al., 2014). Portanto, os relatórios anuais dos serviços veterinários apresentam dados pouco precisos sobre a prevalência (tanto no campo como nos abatedouros) da bTB no país. Utilizando-se de histórico de casos bTB reportados pelos serviços oficiais, Machado (2015) realizou estudo de prevalência usando SCITT nas regiões com de alta ocorrência de bTB e, considerando a representatividade territorial, foram incluídos os distritos do sul (Manhiça e Chibuto), centro (Buzi, Mutarara e Gondola) e norte (Mecanhelas, Mogovolas e Angoche). A prevalência foi estimada em 14,7% (478/3925) nesses oito distritos. Em geral, a prevalência da bTB em Moçambique não é uniforme (MACHADO, 2015). Por outro lado, não se sabe ao certo a contribuição da fauna selvagem na prevalência da bTB. Num estudo realizado por Tanner et al, (2014), a prevalência da bTB em búfalos foi de 8% (5/62) usando o teste rápido Stat pak® no Parque Transfronteiriço do grande Limpopo. Tanto o Parque Nacional do Kruguer na África do Sul, bem como o Gonarezhou no Zimbabwe, já relatou casos de bTB em bovinos e animais selvagens (RODWELL et al., 2001; DE GARINE-WICHATITSKY et al., 2010; GOMO, 2011). No entanto, no distrito de Massingir, adjacente ao parque, a prevalência foi estimada 0,98% (TANNER et al., 2014).

Acredita-se que bTB pode constituir grave problema de saúde pública, uma vez que existem distritos com elevada prevalência como o Govuro com 39,6% de animais positivos (Manfred et al., 2014; Moiane et al. 2014; Machado, 2015). E, segundo Macucule (2009), estima-se que a bTB é uma das mais importantes causas de perdas econômicas na produção bovina, devido à rejeição de carcaças no abatedouro e limitações ao comércio, tanto intracomunitário e entre distritos. Em Moçambique, bTB já foi reportada como causa de rejeição de carcaças em abatedouro, implicando em de grandes perdas econômicas (MUCAVELE, 2008).

As medidas de controle de bTB desde a época colonial envolveram teste de tuberculinização e abate de animais positivos com indenização dos proprietários (MACHADO, 2015). Contudo, teve resultado limitado por falta de insumos para testes dos animais, ou por falta de financiamento para indenização dos criadores (MACHADO, 2015). Atualmente, o Programa Nacional de Prevenção, Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina em Moçambique (PNPCEBT) é uma proposta inspirada no programa brasileiro, mas não foi ainda implementado devido aos custos das ações e organização dos serviços de veterinária, além da produção pecuária que é diferente, tornando a proposta não adequada para a realidade Moçambicana.

2.5 TUBERCULOSE ZOONÓTICA: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR

A bTB é uma das doenças zoonóticas mundialmente negligenciada que necessita atenção urgente, especialmente nos países em desenvolvimento. Seguramente, os maiores prejuízos ocorrem nas comunidades rurais pobres, marginalizadas, que vivem em estreita proximidade com os animais, e com acesso reduzido a alimentos seguros e cuidados de saúde (WHO; FAO; OIE, 2017). Alguns estudos relataram que a infecção em humanos por *M. bovis* e *M. tuberculosis* são clinicamente indistintas (RODWELL et al., 2008; MÜLLER et al., 2013). Porém, há altas taxas de tuberculose extrapulmonar na África devido a infecção por *M. bovis* ou exposição a animais infectados (CARRUTH et al., 2016). Na África, a desnutrição e a imunossupressão pela epidemia do HIV são os principais fatores de risco para a tuberculose zoonótica. Todavia, a doença clínica é comum em pacientes que vivem com HIV/AIDS (COSIVI et al., 1999; SUNDER et al., 2009; TESEMA et al., 2015).

Independentemente da apresentação clínica, *M. bovis* é intrinsecamente resistente à pirazinamida e tem sido reportado de forma sistemática a resistência a estreptomicina o que provavelmente contribui para alta taxa de mortalidade (ROCK et al., 2006; RODWELL et al., 2008). O uso abusivo ou não racional de antimicrobianos na pecuária pode ter sido a causa do aumento da resistência aos fármacos usados contra *M. bovis*. Esse fato pode resultar novos desafios no tratamento e controle da tuberculose humana (CARRUTH et al., 2016).

A caça e aproveitamento sustentável de recursos naturais nas áreas periféricas aos parques nacionais, tentando integrar as questões de desenvolvimento e conservação, constituem novos fatores de risco para a transmissão de patógenos, uma vez que são agendas políticas (ETTER et al., 2006).

As diferentes doenças zoonóticas compartilham fatores de risco comuns. Estratégias de controle bem planejadas podem reduzir os riscos de várias doenças, aumentando sua eficácia geral em termos de custos e recursos (WHO; FAO; OIE, 2017). Embora a tuberculose zoonótica seja uma preocupação global, investimentos para o controle e vigilância da doença só serão implementados adequadamente quando a doença se tornar um problema fora do continente africano (CARRUTH et al., 2016). No entanto, os aspectos de segurança alimentar da infecção por *M. bovis* e as implicações para a saúde pública devem sempre ser levados em consideração. Por outro lado, a profissão médica também deve ser mais consciente da possível presença de *M. bovis* em pacientes humanos com tuberculose (COSIVI et al., 1995).

A educação é a ferramenta mais adequada e eficaz para a prevenção da tuberculose zoonótica, quando as medidas de controle são insuficientes ou inexistentes (COSIVI et al., 1995).

2.6 TUBERCULOSE HUMANA EM MOÇAMBIQUE: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

Na África austral, mais de 60% dos casos de tuberculose humana estão associados a HIV/AIDS e, em Moçambique a incidência da tuberculose em 2016 foi estimada em 551 casos em cada 100 mil habitantes (WHO, 2017). O número de novos casos quase triplicou entre 1997 e 2012 no sul do país. No entanto, a taxa de sucesso do tratamento continua baixa e a mortalidade alta (GARCÍA-BASTEIRO et al., 2017).

Moçambique faz parte da lista dos países mais afetados pela tríade TB, TB/HIV e MDR-TB junto de outros seis países africanos, onde dois deles são países que partilham fronteiras com Moçambique. Os estudos de epidemiologia molecular da tuberculose humana em Moçambique, identificaram genótipos predominantes responsáveis pela transmissão e prevalência da TB. Destes, muitos são comuns aos países vizinhos (VIEGAS, 2015). Em todo país ocorre predomínio da linhagem EAI e LAM (VIEGAS, 2015; MBUGI et al., 2016). Segundo Viegas (2015), no sul do país ocorre alta prevalência da linhagem *Beijing* e uma associação entre o status de infecção por HIV e a linhagem *Beijing*. Viegas (2015) também demonstrou pelos perfis de *spoligotyping* que a linhagem *Beijing* poderia ter sido recentemente introduzida em Moçambique a partir da África do Sul, em associação com a infecção pelo HIV.

A taxa detecção da TB em Moçambique segundo a OMS é de 39%, que é uma das mais baixas da região e a ocorrência da TB-MDR TB-XMRD tem aumentado, cerca de 26 casos em cada 100 mil habitantes (WHO, 2017). A circulação de estirpes resistentes é um desafio na epidemiologia da tuberculose, uma vez que a prevalência de HIV é bastante alta. Por outro lado, a prevalência de HIV representa novo desafio nas estirpes tradicionalmente não tuberculosas aumentando os casos de tuberculose por membros do MTBC e MTN (FALKINHAM III, 1996; NUNES et al., 2008; WHO, 2016, 2017). Pessoas vivendo com o HIV têm maior risco de serem infectadas com estirpes de TB-MDR em comparação com pacientes sem HIV. A real dimensão do problema da resistência aos antimicrobianos na África não é conhecida, devido à insuficiente capacidade laboratorial para o diagnóstico, de transportes/vias de acesso e de notificação (SAMO GUDO et al., 2011).

Em Moçambique, a cobertura do tratamento é 45% e o tratamento dura em média 6 meses com a terapia combinada. Porém, o protocolo de tratamento de pacientes com resistência a fármacos antituberculosos é diferente, custoso, e constitui esforço adicional tanto para o paciente, o clínico, os laboratórios e o erário público. O tempo de tratamento dura em média 18 meses, e a pirazinamida é um dos fármacos indicados. O tratamento de segunda linha para a TB-MDR está disponível para todo o país gratuitamente através do PNCT, embora a maioria dos pacientes que têm acesso ao tratamento residam próximo da capital Maputo e são necessários mais esforços para garantir o diagnóstico rápido da TB-MR e o acesso

ao tratamento com medicamentos de segunda linha, bem como a terapia antirretroviral para todos os que necessitam (SAMO GUDO et al., 2011).

O diagnóstico de MNT nos casos de tuberculose ainda é um problema, por conta da capacidade laboratorial em identificar MNT em Moçambique. Nunes et al, (2008), em pacientes com HIV, reportaram a ocorrência de *M. avium* e *M. simae*. No entanto, López-Varela et al, (2017) identificaram alta prevalência de MNT (*M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* e *M. fortuitum*).

Recentemente, dois estudos foram realizados com objetivo de pesquisar a tuberculose extrapulmonar e conhecer a contribuição da tuberculose bovina nos casos de tuberculose humana. Os resultados indicaram que é necessário direcionar a pesquisa de casos de TB abdominal e outras formas de tuberculose em áreas rurais, onde a prevalência de TB bovina em bovinos é alta para obter melhor resposta sobre a importância da tuberculose zoonótica na saúde pública em Moçambique (VIEGAS, 2015).

2.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS DA TUBERCULOSE BOVINA

A inspeção de carcaça ou a necropsia detalhada constituem importantes ferramentas no diagnóstico da tuberculose bovina, possibilitando o exame anatomopatológico que evidencia as lesões provocadas por *M. bovis*, embora não sejam consideradas patognomônicas, são sugestivas e podem ser usadas para investigações posteriores (CORNER et al., 1990; CORNER, 1994; LAGE et al., 2006; GORMLEY et al., 2014).

A cultura e isolamento em meios seletivos é o método *gold standard* para o diagnóstico da bTB. Porém, têm desvantagens, pois o crescimento é lento e pode variar de seis a doze semanas, além de exigir instalações de biossegurança de nível 3 (CORNER et al., 1990; GORMLEY et al., 2014). A utilização de microscopia pode ser necessária na identificação das colônias. É rápida e barata, porém a visualização de BAAR não é específica de micobactérias, além de ter problemas com amostras que apresentam poucos bacilos quando no exame direto (CORNER, 1994; MEDEIROS et al., 2012).

Métodos de biologia molecular são usados para identificação e diferenciação das espécies de micobactérias, porém são necessárias sequências específicas de

DNA e, por vezes, qualidade adequada que possibilita a ocorrência da reação (TELENTI et al., 1993; WARREN et al., 2006). Novas abordagens de diagnósticos molecular têm sido usadas para bTB. Os avanços na caracterização molecular forneceram novas ferramentas para aprimorar o conhecimento da epidemiologia de *M. bovis* e do controle da tuberculose (MEDEIROS et al., 2012). Algumas técnicas utilizadas para a genotipagem de *M. bovis* recorrem à amplificação pela PCR de regiões do genoma suficientemente estáveis para servirem como marcadores epidemiológicos, mas com potencial polimorfismo para diferenciar estirpes. O *spoligotyping* e MIRU-VNTR fazem parte destas técnicas comumente usadas (KAMERBEEK et al., 1997; SUPPLY et al., 2006). A informação destes métodos tem sido comparada com outros métodos para melhorar a discriminação das estirpes, bem como as relações filogenéticas e filogeográficas (MÜLLER et al., 2009; BERG et al., 2011; SMITH et al., 2011; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012).

2.7.1 *Spoligotyping*

O *spoligotyping* é uma técnica de tipagem que usa a hibridação reversa do produto amplificado para avaliar a diversidade genética de um locus polimórfico compostos por sequências repetidas de 36 pares de bases (pb) chamadas de região de repetição direta (DR), que se alternam por regiões variáveis de 35 a 41 pb chamadas de sequência não repetitiva adjacente, em conjunto com o DR essa região forma o *Direct Variant Repeat* (DVR) (KAMERBEEK et al., 1997). Atualmente esta região é reconhecida como um CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) é uma instância de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas, que em outras bactérias está associada a imunidade bacteriana (GORI et al., 2005).

O *spoligotyping* gera um *fingerprint* "impressão digital" ou assinatura através das regiões espaçadoras variáveis que indica a presença ou ausência de sequência espaçadora que pode resolver a identidade das espécies com uma boa resolução que é suficiente para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis* e *M. africanum* (SUPPLY et al., 2003). No entanto, não consegue diferenciar estirpes do MTBC (VAN SOOLINGEN et al., 1993). Apesar desta limitação, *spoligotyping* é uma técnica rápida e barata. Elevado número de amostras pode ser usado, e pode ser associada a outras técnicas. Possui grande banco de dados de perfis de *spoligotyping*

disponíveis publicamente (BAUER et al., 1999; KREMER et al., 1999; ROCHA et al., 2013).

2.7.2 MIRU -VNTR

A técnica de tipagem conhecida VNTR (*variable number of tandem repeats typing*), para de micobactérias é conhecida como MIRU (*mycobacterial interspersed repetitive unit*). Caracteriza o número de repetições em tandem de 24 loci diferentes. Avalia o tamanho dos amplificadores que derivam da PCR com primers específicos para cada locus. Estas regiões de minissatélites estão dispersas em 41 regiões ao longo do genoma bacteriano. A técnica permite detectar os polimorfismos existentes entre diferentes estirpes, além de apresentar fácil implementação (SUPPLY et al., 2001).

2.7.3 Complexos clonais

Os membros de MTBC são oriundos de um único ancestral e pequenas diferenças são encontradas entre os elementos, como o caso de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e outras deleções (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2005). Com este princípio é possível diferenciar estirpes e criar relações filogenéticas e filogeográficas entre as estirpes (COMAS et al., 2009; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014). Por esta razão são realizadas as análises dos complexos clonais de *M. bovis*. O conjunto de estirpes que são descendentes de uma única célula, ancestral comum mais recente, e que apresenta todas as características derivadas desse ancestral, chama-se complexo clonal (SMITH, 2012). Essa é técnica relativamente nova e útil para a interpretação de relações epidemiológicas de modo a responder aspectos relacionados com a patogenicidade e distribuição geográfica do *M. bovis*. São conhecidos cinco complexos clonais: africano 1, africano 2, europeu 1, europeu 2 e, recentemente, descrito o africano 3 (MÜLLER et al., 2009; BERG et al., 2011; SMITH et al., 2011; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012; SANOU et al., 2014). Os complexos clonais estão relacionados com assinaturas de *spoligotyping*, distribuição geográfica e/ou SNP e, por ser uma técnica relativamente nova, apresentam limitações como o fato de existirem outros complexos clonais não descritos (SMITH, 2012; ZIMPEL, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o mapeamento e distribuição dos isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de casos de tuberculose bovina em Moçambique

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar as micobactérias envolvidas nos casos de tuberculose bovina em Moçambique
- Mapear e distribuir os isolados de acordo com a origem
- Utilizar as técnicas de *Spoligotyping*, *Variable Number Tandem Repeat* e RD complexo clonal para caracterização genotípica dos isolados de complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- Caracterizar o sistema produtivo de bovinos de sul de Moçambique

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

Moçambique é um país localizado na costa oriental da África Austral. Tem como limites ao norte, a Tanzânia; a noroeste, o Malawi e a Zâmbia; a oeste, o Zimbabwe, a África do Sul e a Suazilândia; ao sul, a África do Sul; a leste, o Oceano Índico numa região conhecida por Canal de Moçambique. Em termos administrativos, Moçambique possui 11 províncias, 154 distritos e uma população estimada em 28 861 863 habitantes, com aumento populacional de 28,7% nos últimos 10 anos de acordo com os resultados do Censo de 2017. Os grandes centros urbanos são Maputo, Beira e Nampula. Porém, existe uma assimetria entre o norte e o sul do país, onde o sul é mais desenvolvido que o norte como resultado da herança da estrutura econômica colonial caracterizada por assimetrias. Esta assimetria também é observada entre a cidade e o campo, onde a cidade é mais desenvolvida que o campo. Cerca de 80% da população Moçambicana pratica agricultura de subsistência e em pequenas unidades. No entanto, mais de 90% das terras com aptidão agrícola nunca foram exploradas. Existem em Moçambique 10 zonas agroecológicas distribuídas por todo país, favoráveis para a prática de agricultura e pecuária. O produto interno bruto do país em 2016 foi de 11 bilhões de dólares, sustentado pela agricultura, pecuária, turismo, pesca e recursos minerais e energéticos (INTERNATIONAL MONETARY FUND, 2018).

O clima do país é tropical úmido, influenciado pelo regime de monções do Índico e pela corrente quente do canal de Moçambique, com estações secas de maio a setembro e a estação das chuvas entre outubro e abril.

O presente estudo foi realizado com isolados provenientes de sete províncias de Moçambique. As amostras foram obtidas da inspeção *post mortem* realizada no período de outubro de 2016 a abril de 2017 nos abatedouros Municipais de Maputo e Maxixe, e em dois abatedouros privados, todos localizados no sul do país. Estes são os principais abatedouros de bovinos na região sul de Moçambique, que recebem animais provenientes das regiões central e sul do país, uma região que compreende seis províncias (Tete, Manica, Sofala, Zambézia, Inhambane, Gaza e Maputo) incluindo a cidade Maputo, correspondendo a cerca de 70% do território nacional. Foram também obtidas amostras do banco de amostras da Faculdade de

Veterinária da Universidade de Eduardo Mondlane (FACVET-UEM) e da rotina do diagnóstico de Laboratório Central de Veterinária da Direção de Ciências Animais do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (LCV-DCA-IIAM) no período em estudo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA PRODUTIVO DE BOVINOS

A caracterização do sistema produtivo de bovinos foi baseada nos inquéritos sobre a situação socioeconômica e o conhecimento de tuberculose bovina e seu risco para saúde humana, realizados no distrito Massingir, situado ao sul de Moçambique na província de Gaza. O distrito de Massingir é adjacente ao Parque Nacional de Limpopo, e devido à proximidade ao Kruger National Park da África, há grande interação entre animais domésticos e selvagens. Esses dois parques, em conjunto o Gonarezhou, pertencem ao Parque transfronteiriço do Grande Limpopo envolvendo os países de África do Sul, Moçambique e Zimbabwe. O distrito é composto por três postos administrativos: Massingir, a capital do distrito, Mavodze e Zulo. Estes estão subdivididos em oito localidades nas quais existem 28 aldeias. Destas aldeias, 15 localizam-se dentro do PNL e as restantes estão fora do parque. A seleção dos criadores para o questionário foi feita com base na amostragem por conveniência, baseando-se nos dados disponíveis do estudo realizado anteriormente sobre a prevalência da bTB no distrito de Massingir (TANNER et al., 2014). Foram amostrados 1025 criadores de todas as aldeias. Porém, este tamanho da amostra foi reduzido para 786 famílias, pelo fato de alguns criadores usarem o mesmo curral, sendo assim considerados como família única.

4.3 PREVALÊNCIA DE LESÕES SUGESTIVAS DE bTB NOS ABATEDOUROS

A prevalência de bTB ao abate foi calculada considerando-se os registros de todos animais que foram abatidos e inspecionados, de outubro de 2016 a outubro de 2017, nos abatedouros Municipal de Maputo e de Machava. De outubro de 2016 a abril de 2017, em paralelo ao trabalho dos veterinários que atuavam na inspeção de carcaças nos abatedouros, esse mesmo procedimento foi realizado pelo autor desta tese.

4.4 COLETA DE AMOSTRAS

As colheitas foram realizadas nos abatedouros privados de Manhiça e de Machava, e municipal de Maputo, localizados na província de Maputo e no abatedouro municipal de Maxixe, localizado na província de Inhambane. Ao exame *post mortem*, realizado para se verificar a presença de lesões sugestivas de tuberculose bovina, foram examinados os principais linfonodos da cabeça, tórax, abdome e membros, bem como pulmões, fígado, baço, rins e intestinos. Detectada a lesão sugestiva de bTB (lesão granulomatosa, nodulares, caseosas ou purulentas, calcificada ou liquefeita de cor amarelada, leitosa ou creme, circunscrita ou não, de vários tamanhos), realizou-se a coleta de cerca de 15 a 25 gramas da massa tecidual da lesão para um tubo coletor estéril, devidamente identificado e transportado em bolsa térmica até a FACVET. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em um freezer a -20 °C e processadas no máximo em 72 horas após a coleta.

Foram utilizadas também amostras de lesões mantidas a -20 °C na FACVET, oriundas de coletas realizadas nos últimos cinco anos de animais abatidos por vários propósitos. Além disso, também foram utilizadas amostras de tecidos com lesões sugestivas de bTB que tinham sido encaminhadas ao LCV para o diagnóstico de tuberculose bovina.

Durante a coleta de amostras, teve-se o cuidado de também obter informações relativas ao animal, como por exemplo a identificação do local de proveniência e outros dados disponíveis na guia de trânsito animal.

3.5 CULTURA E ISOLAMENTO BACTERIANO

As amostras foram processadas no Laboratório Nacional de Referência de Tuberculose Humana (LNRT) em Moçambique para o isolamento de micobactérias.

Em uma cabine de biossegurança BSL 3 (*Biosafety Level 3*), foram transferidas cerca de 5g de tecido e/ou órgão contendo lesão sugestiva para um gral ou placa de petri descartável tendo o cuidado de incluir a área de transição entre a massa caseosa e o tecido intacto e macerada com ajuda de pistilo, bisturi e tesoura, de modo que a superfície de contato fosse maior. Em seguida, foram transferidas para um saco plástico e adicionados 15mL de água destilada e, posteriormente,

homogeneizadas com ajuda de um *stomacher*®400 *circulator*. Após a homogeneização, a fase líquida foi transferida para um tubo cônico Falcon® de 50mL e submetidas ao processo de descontaminação por método de Petroff segundo protocolo descrito por Ambrósio et al. (2008) e modificações feitas por Machado (2015) que consiste na descontaminação com uma base (NaOH) e neutralizada por um ácido clorídrico (Anexo 3). Após a descontaminação o material foi centrifugado a 12.000G por 15 min, descartado o sobrenadante e o precipitado ressuspenso em 100 µl de água destilada e foi inoculado em duplicata em garrafa para cultura celular sem filtro 25cm² (50ml) estéril ou tubos de ensaio 18 mm com tampa rosca contendo meio Stonebrink (ST) e Lowenstein-Jensen (LJ), e incubados a 37 °C até 90 dias (IKUTA et al., 2016).

Na primeira semana, fez-se o controle diário dos tubos para verificar possíveis contaminações e observação semanal para crescimento das colônias, verificando a forma, o aspecto, a coloração e o tempo de crescimento. As colônias com características compatíveis com micobactérias foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen para a identificação fenotípica. Os isolados classificados como BAAR foram submetidos à extração e purificação do DNA genômico.

4.6 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB, segundo protocolo de Van Soolingen et al. (1991), com adaptações que consistiu na adição de 400 µL de Tampão TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA pH 8,0) a 50 mg de massa bacteriana previamente inativada por 100 °C por 10 min. Em seguida adicionou-se 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e incubou-se a 37 °C por 18 horas (overnight). Após esse período foi adicionado 75 µL da solução de proteinase K e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) [5 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 70 µL de SDS (10%)]. Agitou-se e, em seguida foi incubado a 65 °C por 10 min. Foram adicionados 100 µl de NaCl a 5M (Cloreto de sódio) e, posteriormente, 100 µL da solução CTAB/NaCl (4,1 g de NaCl e 10 g de brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB em 100 mL de H₂O) preaquecido a 65 °C e a mistura foi agitada e novamente incubada a 10 min a 65 °C. Posteriormente, foi acrescentado 750 µL de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, após a agitação por 10 s, a mistura foi centrifugada a 12.000G por 7 min. Do sobrenadante foi transferido 450 µL da fase aquosa para um novo microtubo e acrescentou-se 450

μL de isopropanol (2- propanol) para precipitar e a amostra foi mantida a -20 °C por 30 min e seguidamente foram de novo centrifugadas a 12.000G por 15 min, e o sobrenadante foi desprezado para acrescentar 1000 μL de etanol 70% gelados, seguido de centrifugação a 12.000G por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e, após a secagem do microtubo por 56 °C por 10 min, o DNA foi eluído com 50 mL de tampão TE e armazenado a – 20 °C até ao uso.

A qualidade e fragmentação do DNA foi medida por um aparelho Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Os DNA genômicos foram então enviados para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) para análises moleculares.

4.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MEMBROS DO MTBC

A identificação molecular dos membros do MTBC foi baseada na utilização de dois conjuntos de PCR multiplex. O primeiro é o TB multiplex que identifica o gênero *Mycobacterium*, o complexo MTBC e o complexo *M. avium-intracellulare* e o RD multiplex que discrimina os membros do MTBC.

4.7.1 TB *Multiplex* PCR

O TB multiplex PCR, descrito por Wilton e Cousins (1992), tem como alvo os genes 16S rRNA específico para o gênero *Mycobacterium*, 16S rRNA das regiões hipervariáveis do complexo MAI, e MPB70 específico para o complexo *M. tuberculosis*. A preparação da master mix do PCR TB multiplex num total 12 μL de reação foram usados 5,5 μL de água ultrapura, 2 μL de dNTP a uma concentração de 1,25 mM, 1,25 μL do buffer, 0,375 μL de MgCl₂ a 50 mM e 0,075 μL de Taq DNA polimerase (1,25 U) e 0,3 μL de cada um dos seis primers todos na concentração de 10 pmol/μL, e após a preparação da master mix adicionou-se 1μL do DNA.

A interpretação dos resultados é a combinação do tamanho da banda para o gênero (1080 pb) e as outras. Complexo *M. tuberculosis* (1080pb e 372pb), *M. avium* (1080 pb e 180 pb), *M. intracellulare* (1080pb e 850pb). Em caso de ausência da banda de 1080 pb e presença das descritas anteriormente considera-se válida a

interpretação. O quadro 1 mostra os primers utilizados para identificação de MTBC e outras micobactérias.

Quadro 1 - Primers usados no TB multiplex PCR e tamanho esperado para identificação do gênero *Mycobacterium* e complexos MTBC e MAI. São Paulo, 2016-2018.

Primers	identificação	Sequências (5'-3')	Genes alvo	Pares de base
Mycgen- F	Gênero <i>Mycobacterium</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	1080
Mycgen- R		TGCACACAGGCCACAAGGGA		
TBd-1	MTBC	GAACAATCCGGAGTTGACAA	MPB70	373
TBd-2		AGCACGCTGTCAATCATGTA		
MycInt	<i>M.intracellulare</i>	CCTTTAGGCGATGTCTTTA	16S rRNA	850
MycAv	<i>M.avium</i>	ACCAGAAGACATGCGTCTTG		180

Fonte: (WILTON; COUSINS, 1992)

Os ciclos de PCR TB multiplex foram os seguintes: uma desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido por uma desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão de 72 °C por 1min 30 s durante 35 ciclos e por fim uma extensão final de 72 °C.

4.7.2 RD Multiplex PCR

As amostras que foram identificadas como sendo MTBC no TB Multiplex PCR foram submetidas a identificação pelo RD4 PCR Multiplex, que é um PCR multiplex descrito por Warren et al. (2006), três primers em uma reação de 12 µL de volume total onde foram usados 5,93 µL de água ultrapura, 2,5 µL de dNTP (1,25 mM), 1,25 µL do buffer do MgCl₂ e 0,375 µL de MgCl₂ a 50 mM e 0,075 µL de Taq DNA polimerase (1,25 U) e uma série de seis primers que foram usados todos na concentração de 10 pmol/µL, para cada um desses primers adicionou-se 0,3 µL e após a preparação da máster mix adicionou-se 1 µL do DNA.

A interpretação dos resultados é a confirmação da presença ou ausência da região RD em análise. No quadro 2 estão apresentados os primers e o esperado para a identificação dos membros do MTBC e a chave para interpretação da diferenciação do *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

Quadro 2 - Primers usados na diferenciação dos membros do MTBC e o tamanho esperado. São Paulo, 2016-2018.

Primers	Identificação	Sequências (5'-3')	Genes alvo	Pares de base
RD4-1	Diferencia <i>M.bovis</i> de <i>M.tuberculosis</i>	ATGTGCGAGCTGAGCGATG	Região RD4	268/172
RD4-2		TGTACTATGCTGACCCATGCG		
RD4-3		AAAGGAGCACCATCGTCCAC		

Fonte: (WARREN et al., 2006)

Os ciclos de PCR RD4 multiplex utilizados foram os seguintes: uma desnaturação inicial a 95 °C por 10min, seguido por uma desnaturação a 94 °C por 1min, anelamento a 55 °C por 1min e extensão de 72 °C por 1min 30 s durante 35 ciclos e por fim uma extensão final de 72 °C.

4.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS MNT

Para a identificação das micobactérias não tuberculosas usou-se o PCR de restrição enzimática também conhecido por PRA, descrito por Telenti et al. (1993). Um método de identificação rápida de micobactérias não tuberculosas.

4.8.1 PCR de Restrição enzimática

Os membros do gênero *Mycobacterium* possuem o gene *Hsp65* que codifica a proteína do choque térmico e epítomos comuns nas micobactérias. Com base neste princípio, fez-se um PCR tendo como alvo esse gene. Foram feitas reações de 12µL, 6 µL GoTaq® Green Master Mix, 2X promega (2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂), 4,4 µL de água ultrapura e 0,3 µL de cada oligonucleotídeo iniciador Tb11 (5'ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5'CTTGTCTGAACCGCATACCCT) todos na concentração de 10 pmol. Em seguida foi adicionado 1 µL do DNA a cada tubo de reação. Para a reação de PCR o termociclador foi programado para 35 vezes do ciclo de amplificação, 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, seguidos de um ciclo de extensão final de 72 °C por 10 min.

O produto adquirido da PCR foi de 441 pb, caracterizado como pertencente ao gênero *Mycobacterium*. Então, este produto foi submetido à digestão pelas

enzimas de restrição *BstEII* (Promega,Wi, USA) e *HaeIII* (InvitrogenTM, CA, USA) a uma concentração de 10 U/ μ L. Segundo recomendações do fabricante a digestão enzimática foram realizadas num volume de 3 μ L de reação de *BstEII* 0,5 μ L, 0,06 μ L de BSA - soro albumina bovina, (0,6 μ L 10x *Buffer*, 2,19 μ L de água ultrapura) e 3 μ L do produto de PCR, submetendo-as a incubação de 60 °C por 60 min, em relação a *HaeIII*, a reação foi de 0,15 μ L da enzima *HaeIII*, 0,3 μ L de REact e 2,55 μ L de água ultrapura) e 3 μ L do produto de PCR submetendo-as a incubação a 37 °C, por 90 min. A interpretação das bandas foi de acordo com o site: *Identification of Mycobacteria* (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

4.9 TIPAGEM MOLECULAR DOS MEMBROS DE MTBC

Para discriminar as estirpes do MTBC foram utilizados três métodos de tipagem molecular: *spoligotyping*, MIRU-VNTR, RD complexo clonal.

4.9.1 Genotipagem pelo método de *spoligotyping*

O DNA das micobactérias foi submetido a análise de polimorfismo pela técnica de tipificação molecular *spoligotyping*, que é um método baseado em PCR seguindo o protocolo descrito por Kamerbeer et al. (1997). O PCR consistiu na amplificação das regiões espaçadoras utilizando oligonucleotídeos iniciadores (primers) DRa marcado com biotina e DRb. Como controle positivo foram usados, DNA cromossômico da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* e de *M. bovis* BCG, e como controle negativo foi usado água destilada. Para obtenção de volume total de 50 μ L da máster mix foram adicionados 1 μ L DNA, 1 μ L primer DRa e DRb todos a 20 pmol, 0,4 μ L dNTP- (2.5 mM de cada, concentração final 0.2 mM de cada) 5 μ L tampão (10x super buffer), 3 μ L MgCl₂, 0,5 μ L taq polimerase (5 U/ μ L), 38,1 μ L de água. Tanto as amostras quanto os controles positivos e negativos foram submetidos à reação de amplificação em um termociclador. O quadro 6 ilustra os ciclos de amplificação a usados na reação de PCR.

Para a reação de PCR o termociclador foi programado para 1 ciclo de 96 °C por 3 min, seguido 20 vezes do ciclo de amplificação, 96 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 30 s; seguidos de um ciclo de extensão final de 72 °C por 5 min.

Para a hibridização, foram adicionados 100 mL de 2x SSPE (0,2 M Na_2HPO_4 , 3,6 M NaCl, 20 mM EDTA, (pH 7.4)/0.1% SDS, a uma tubo circular e aquecido enquanto isso o produto de PCR foi desnaturado a 99 °C durante 10 min. Após a desnaturação, os microtubos contendo o produto de PCR foram imediatamente arrefecidos em gelo. Paralelamente foi lavada uma membrana fornecida no kit, por submersão em 250 ml de 2x SSPE/0.1% SDS por 5 min a 10 min a 60 °C. Teve-se o cuidado de virar a membrana e repetir o procedimento. A membrana foi em seguida colocada num mini-blotter (Miniblotter® 45) contendo suporte para a membrana e tomando em consideração a posição para aplicação correta de oligonucleotídeos e o excesso do líquido de lavagem foi retirado por aspersão com recurso a uma bomba de vácuo.

Fez-se a diluição do produto amplificado com 140 µL de 2x SSPE/0.1% SDS, foi adicionado a membrana após a homogeneização tendo o cuidado para não fazer bolhas, por cada ranhura para hibridização, as duas canaletas externas (de cada lado) e sempre que houvesse canaletas vazias foram preenchidas com 2x SSPE/0.1% SDS. A hibridização foi realizada a 60 °C por 60 min em uma superfície horizontal sem agitação no hibridizador. Após este período, fez-se com cuidado o transporte do mini-blotter a uma superfície horizontal sem agitação evitando a contaminação com produto das canaletas vizinhas. As amostras foram retiradas do mini-blotter por aspiração e a membrana foi lavada duas vezes durante 10 min com 100 ml de 2x SSPE/0.5% SDS a 60 °C. Em seguida colocou-se a membrana em outro tubo circular e deixou-se esfriar para evitar a inativação da peroxidase no próximo passo. Foram adicionados 5 µL do conjugado streptoavidina-peroxidase (500U/ml) a 20 mL de 2x SSPE/0.5% SDS e seguidamente a membrana foi incubada nesta solução por 60 min a 30- 37 °C, virando a membrana em 30 min.

Posteriormente, a membrana foi lavada duas vezes com 150 mL de 2xSSPE/0.5% SDS durante 10 min a 30- 37 °C tendo o cuidado de repetir o procedimento com a membrana ao avesso. Seguidamente se fez a lavagem da membrana por duas vezes com 150 mL 2x SSPE na temperatura de 30 a 37 °C por 5 min. Após a lavagem com 12 mL de ECL, a membrana foi incubada no líquido para detecção da quimiluminescência do DNA hibridizado por 1min.

O DNA hibridizado foi detectado pelo método de quimiluminescência e por exposição a filme de raios X em uma câmara escura. A membrana foi regenerada por lavagem em 1% de SDS a 80 °C e acondicionada a 4 °C para conservação até

uso posterior em um ambiente selado contendo 20 mM EDTA, pH 8, (ISOGEN, 2006).

O *spoligotyping* de cada amostra foi determinado com base na combinação numérica da presença ou ausência dos espaçadores e identificados de acordo com banco de dados mbovis.org.

4.9.2 Genotipagem pelo método de MIRU- VNTR

A técnica de tipagem MIRU-VNTR foi realizada a todos isolados identificados como *M. bovis*. Para a técnica de MIRU-VNTR descritas por Supply et al. (2006). Foram utilizados 24 pares de primers. Para um volume final de 12 µL foram acrescentados 1 µL de DNA genômico a 1 ng/µL, 6 µL GoTaq® Green Master Mix, 2X promega (2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂), 4,4 µL de água ultrapura e 0,3 µL de cada primers F-R do MIRU ou VNTR correspondente em anexo os primers utilizados. A amplificação foi realizada com 1 ciclo de 95 °C por 15 min; 39 ciclos com 1 min a 94 °C; 1 min a 59 °C; 1 min e 30 s a 72 °C, com 1 ciclo de 72 °C por 10 min. O tamanho da banda foi estimado por comparação com padrão de pares de base conhecido (25 pb) e de acordo com o manual MIRU-VNTR e utilizando o programa no site: MIRU-VNTRplus www.miru-vntrplus.org e a análise de agrupamento também foi realizada com o auxílio desta interface.

4.9.3 RD complexo clonal PCR

Todos isolados identificados como *M. bovis* foram submetidos a um PCR para análise do complexo clonal, que é uma forma de discriminar por região geográficas os clones de *M. bovis*. Foram utilizados um par de primers para o complexo clonal europeu 1 (RDEu1_FW: 5'-CCGATGAACTTGGCCCCACAG-3'; RD Eu1_ Rv 5'-CGTGGTGGTGGGATGTCTTG-3') e os produtos de PCR, após eletroforese, o fragmento de 1206 pb foi considerado como região RD Eu1 intacta e um fragmento de 400 pb se a região fosse deletada; europeu 2 (RDEu2_Fw: 5'-GTCTTACCGTCCAGCACATCC-3'; RDEu2_RV:5'-CAGGTGCAACGCGATTTC-3'); e em relação aos complexos clonais africano 1 e africano 2 foram usados três primers, *forward*, *reverse* e um interno: RD Af1 (FW, 5'-

ACTGGACCGGCAACGACCTGG-3' e Rev, 5'CGGGTGACCGTGAAGTGCAC-3') e um *primer* ligando com a região interna de RDAf1 (Int Rev, 5'-CGGATCGCGGTGATCGTCGA-3'). Para o complexo africano 2, RD Af2 (RD Af2_Fw, 5'-ACCGCCCTGTCCTATGTGAG-3', RD Af2_Rev, 5'-TGACGGTTGCCTTTCTTGAC-3') e um iniciador que se liga com a região interna de RD Af2 (RD Af2_IntRev, 5'-CACTGTCTCCGCTCATCATG-3'.

Para um volume final de 12 µL foram acrescidos 1,25 µL de DNA genômico, 6,25 µL GoTaq® Green Master Mix, 2X promega (2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂), 3,75 µL de água ultrapura e 0,625 µL de cada primer, em relação ao complexo clonal europeu 2. Fez-se a digestão enzimática com a endonuclease NarI, seguindo as recomendações do fabricante num volume de total de 10 µL (8,5 µL de água ultrapura, 1 µL do buffer e 0,5 µL da enzima NarI) do preparado foi adicionado 5 µL do produto de PCR e incubados a 37 °C durante 1 hora. Quadro 3 estão os ciclos de PCR no termociclador.

Quadro 3- Ciclos de PCR para a identificação de complexos clonais, São Paulo, 2016-2018.

Complexo	Desnaturação I	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Extensão F
Europeu 1	95 °C/5min	94 °C/1min	58 °C/1min	72 °C/2min30s	35	72 °C/10min
Europeu 2	95 °C/5min	95 °C/1min	62 °C/1min	72 °C/01min	35	72 °C/07min
Africano 1	96 °C/5min	96 °C/30s	60 °C/30s	72 °C/01min	32	72 °C/10min
Africano 2	96 °C/5min	96 °C/30s	60 °C/30s	72 °C/01min	32	72 °C/10min

Fonte: (MÜLLER et al., 2009; BERG et al., 2011; SMITH et al., 2011; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012)

O quadro 4 estão contidos os primers para os diferentes complexos clonais pesquisados e os resultados esperados.

Quadro 4- Primers e tamanho de fragmento esperado para complexos clonais. São Paulo, 2017.

Complexo	Primers	Sequência (5'-3')	Região intacta	Região deletada
Europeu 1	RDEu1-FW	CCGATGAACTTGGCCACAG	1206	1440
	RDEu1-Rv	CGTGGTGGTGGGATGTCTTG		
Europeu 2	guaA2-F	GTCTTACCGTCCAGCACATCC	179	145 35*
	guaA2-R	CAGGTGCAACGCGATTTC		
Africano 1	RDAf1-Fw	ACTGGACCGGCAACGACCTGG	349	531
	RDAf1-Rev	CGGGTGACCGTGAAGTGCAGAC		
	RDAf1-IntRev	CGGATCGCGGTGATCGTCGA		
Africano 2	RDAf2-Fw	ACCGCCCTGTCCTATGTGAG	458	707
	RDAf2-Rev	TGACGGTTGCCTTTCTTGAC		
	RDAf2-IntRev	CACTGTCTCCGCTCATCATG		

*tamanho do fragmento após digestão enzimática.

Fonte: (MÜLLER et al., 2009; BERG et al., 2011; SMITH et al., 2011; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012)

4.10 ELETROFORESE

A revelação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% para os amplificados de produtos de PCR TB *Multiplex*, RD *Multiplex*, Complexo clonal, MIRU-VNTR e Tb11 e Tb12. Para os amplificados da PRA PCR, a concentração foi de 3,5 a 4%. Todos géis foram corados com *SYBR™ Safe DNA Gel Stain* (ThermoFisher scientific) segundo as recomendações do fabricante. Para a identificação dos fragmentos, foram utilizados marcadores de peso molecular de 50 pb e 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen™, NY, USA). Em geral, a voltagem de corrida foi de 80 volts e 400 amperes em TBE 0,5X (1 M de Tris, 0,9 M ácido bórico, 0,01 M de EDTA). A visualização e documentação do gel foi feita com auxílio do fotodocumentador automático.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA PRODUTIVO DE BOVINOS EM MOÇAMBIQUE

De acordo com as constatações dos inquéritos, o sistema produtivo de bovinos em Moçambique é caracterizado por pequenos produtores, de produção familiar, sem assistência veterinária e o objetivo de criação é o prestígio social, comercializando os animais apenas para necessidades e/ou cerimônias tradicionais.

Os animais são alimentados a base de pastos comunitários sem existência de cercas e são recolhidos durante a noite para a pernoite. Em geral, adolescentes e jovens cuidam dos animais durante o pastoreio podendo inclusive existir menores de 10 anos fazendo esse trabalho. Os pastores são remunerados em valores monetários ou animais a cada dois anos.

No distrito de Massingir, em geral, 75% dos criadores do setor familiar possuem até 28 animais. Dos 764 criadores inquiridos possuem em média 23 animais em seu rebanho com intervalo de 1 a 300 animais, dos quais 96% (733/764) dos criadores afirmaram ter animais da raça landim em seu rebanho. Em relação as raças especializadas, 68% não tinham raça Brahman em seu rebanho e 1% não sabia identificar. Do total, 52% (400/764) dos criadores não sabem estimar a idade ao primeiro parto dos animais do seu rebanho, enquanto 29% (224/764) afirmaram ocorrer aos 3 anos, 4% aos 2 anos e 13% aos 4 anos respectivamente. Apenas 5,2% dos produtores rurais vendem o leite produzido pelas suas vacas.

Foi observado que a pecuária é a uma atividade que garante rendimento a muitos agregados. Posto que para 52,7% foi a fonte primária de rendimento (tabela 1) e muitos criadores praticam tanto a agricultura quanto a pecuária.

Tabela 1. Grau de importância da pecuária no rendimento dos agregados (643) detentores de bovino no sul de Moçambique.

Grau de importância	Porcentagem (%)
Atividade principal	52,7
Atividade Secundaria	43,0
Atividade terceira	4,3
Total	100

A utilização de animais de tração é também uma fonte de rendimento para cerca de 10% dos proprietários, porém auxilia quase 59% dos agregados na obtenção de rendimentos.

Do total, 75% dos proprietários afirmou vender, em média, três animais (mediana 2) por ano e em média compram quatro animais por ano. Os animais adultos são vendidos em média por 13.800,00MT (\$220,00) por unidade e cerca de 75% dos criadores vendem a 15.000,00MT (\$240,00) por unidade e compram em média de 11.300,00MT (\$145,00) e 75% compram a 12.000,00MT (\$155,00). A principal motivação para entrada e saída de animais é devido a cerimônias tradicionais. Todos criadores afirmaram que raramente abatem os animais e, quando, o fazem, é no local, sem a presença de um veterinário ou inspetor, sempre destinado a uma ocasião especial na família que vai desde cerimônias religiosas até festas familiares.

5.2 PREVALÊNCIA DA TUBERCULOSE BOVINA NOS ABATEDOUROS DE MAPUTO

A prevalência geral de lesões sugestivas de tuberculose bovina nos abatedouros de Maputo durante o período de outubro de 2016 a outubro de 2017 foi de 0,63% (83/13127).

A tabela 2 apresenta as prevalências das lesões sugestivas de bTB no abatedouro Municipal de Maputo e da Machava.

Tabela 2 - Prevalência de lesões sugestivas de bTB nos Abatedouros da Machava e Municipal de Maputo

Abatedouros	outubro a abril		maio a setembro		Global	
	Pos/examinados	Prevalência	Pos/examinados	Prevalência	Total de Pos /examinados	Prevalência global
Machava	5/827	0,60	14/971	1,45	19/1798	1,06
Municipal	32/6399	0,50	32/4930	0,65	64/11329	0,56
Total	37/7226	0,51	46/5901	0,78	83/1329	0,63

Fonte: Inlamea, 2018.

A prevalência estimada de lesões sugestivas de bTB na inspeção de rotina no abatedouro de Machava foi de 0,60% (5/827) e da inspeção realizada neste estudo, paralelamente, foi de 1,81 (15/827).

Macroscopicamente, as alterações mais comuns observadas nos órgãos e/ou linfonodos afetados foram a presença de lesões brancas amareladas circunscritas de vários tamanhos e números. Embora os dados no abatedouro municipal não tenham sido retirados de forma sistemática, cerca de 90% das lesões foram identificadas nos linfonodos da cabeça e tórax e cerca de 80% tinham um envolvimento dos pulmões, fígado e baço. Muitas vezes não foi possível inspecionar detalhadamente as vísceras devido ao volume de animais abatidos contrariamente ao abatedouro de Machava.

Na grande maioria, as lesões estavam localizadas nos linfonodos mediastinais, retro-faríngeo e pré-escapulares, sem lesões macroscópicas visíveis nos pulmões.

No total, cerca de 12 animais (dois no abatedouro de Machava e dez no abatedouro municipal de Maputo) apresentaram lesões generalizadas com envolvimento da carcaça e linfonodos mesentéricos. Na Tabela 3 estão as localizações das lesões sugestivas de bTB.

Tabela 3 - Localização das lesões sugestivas de bTB nos abatedouros de Machava e municipal de Maputo

Localização da lesão	Abatedouro da Machava		Abatedouro Municipal		Global	
	N	%	N	%	Total	%
Linfonodos	8	53,3	0	0	8	19,1
Pulmões, fígado e linfonodos	5	33,3	17	62,9	22	52,4
Lesões generalizadas*	2	13,4	10	37,1	12	28,5
Total	15	100	27	100	42	100

*lesão generalizada – lesões disseminadas no pulmão, fígado, intestinos e na carcaça.

Fonte: Inlamea, 2018.

As imagens (Figura 1) demonstram as lesões sugestivas no pulmão, fígado e na carcaça.

Figura 1. Fotografia dos pulmões (A) e fígado (B) mostrando lesões granulomatosas maciças (tuberculosas) e caseosas de bovinos inspecionados nos abatedouros de Sul de Moçambique.

Fonte: Inlamea, 2017.

O distrito de Machanga foi o que mais contribuiu para os casos identificados como tuberculose em nível de abatedouros durante o primeiro período de análise no abatedouro municipal de Maputo. Já no abatedouro de Machava, as amostras internas, bem como as originárias de Matutuine, tiveram igual peso em contribuição de lesões sugestivas de bTB. No gráfico 1 e 2 estão representadas as origens das lesões sugestivas de bTB nos abatedouros municipal de Maputo e de Machava.

Gráfico 1 – Frequência de amostras com lesões sugestivas de bTB coletadas no abatedouro Municipal de Maputo e a positividade na cultura e os distritos originários

Fonte: Inlamea, 2018.

Gráfico 2 – Frequência de amostras com lesões sugestivas de bTB coletadas no abatedouro de Machava e a positividade na cultura e os distritos originários

Fonte: Inlamea, 2018.

A tabela 4 apresenta o número de amostras com lesões sugestivas de bTB obtidas em todos abatedouros que providenciaram amostras para este estudo. Não foi possível obter dados suficientes para análise de prevalência nos abatedouros municipal de Maxixe e privado de Manhiça.

Tabela 4 - Número de amostras com lesões sugestivas de bTB obtidas em todos abatedouros

Abatedouros	Localização	Número de amostras	Percentagem
Municipal Maxixe	Inhambane	47	52,2
Municipal de Maputo	Maputo	27	30,0
Machava	Maputo	15	16,7
Manhiça	Maputo	1	1,1
Total		90	100

Fonte: Inlamea, 2018.

5.3 CULTURA E ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA

Um total de 92% (158/172) das amostras apresentaram isolamento sugestivo do gênero *Mycobacterium*, com colônias rugosas, ásperas ou lisas, em

formato individualizado ou não, com a coloração de amarela, marrom, alaranjada ou creme (Figura 2).

Figura 2 – Aspectos morfológicos das colônias com crescimento sugestivo ao gênero *Mycobacterium*.

Fonte: Inlamea, 2017.

Legenda: diferentes aspectos morfológicos das colônias do gênero *Mycobacterium*

A taxa de contaminação foi de 2% (4/172) e 10 amostras não apresentaram crescimento ao final de 12 semanas de incubação, correspondendo a 6% dos isolados.

A confirmação fenotípica pela coloração de Ziehl-Neelsen foi possível em 63,6% das amostras (91/143) e, das quais, em cerca de 50% foi possível visualizar o fator corda.

A província de Inhambane apresentou maior proporção de positivos na cultura seguido da província de Manica. Embora seja a província de Maputo a que mais contribui com as amostras.

Gráfico 3. Frequência de cultura positiva em relação ao total de amostras de acordo as províncias de origem.

Fonte: Inlamea, 2017.

5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

Um total de 143 amostras de DNA dos isolados foram submetidas ao TB PCR Multiplex usando três conjuntos de primers nas reações de PCR visando a identificação do gênero *Mycobacterium*, complexo MTBC e o complexo MAI. Destas, 104 das 143 foram classificadas como do gênero *Mycobacterium* correspondendo a 73% dos isolados. Não foi possível obter resultado consistente em 39 isolados, considerando-se negativas para os primers descritos.

Um total de 80 isolados apresentaram resultado positivo para o MTBC dos 104 submetidos a testagem com o primers RD4. Em relação ao total de amostras com lesões, essa fração corresponde a 47% das amostras totais (80/172). A diversidade fenotípica dos isolados identificados como complexo *M. tuberculosis* (MTBC) variou na coloração, formato e aspectos das colônias (Apêndice A).

5.5 DIVERSIDADE MOLECULAR DO MTBC ISOLADOS DE BOVINOS EM MOÇAMBIQUE

Os 80 isolados que foram identificados como sendo de complexo *Mycobacterium tuberculosis* eram provenientes de amostras obtidas de cinco províncias de Moçambique das 11 existentes. Houve uma super-representação das amostras do sul de Moçambique, uma vez que as amostras foram obtidas de quatro abatedouros localizados no sul do país. Cerca de 50% dos isolados identificados como sendo MTBC foram oriundos do centro do país (província de Manica e Sofala) e o restante do sul do país. Os distritos de Govuro e Gondola foram os distritos com mais amostras isoladas como MTBC. Gráfico 4 representa a distribuição dos isolados de MTBC por distritos.

Gráfico 4 – Frequência dos isolados de MTBC de acordo com a origem.

Fonte: Inlamea, 2017.

Dos 80 isolados, classificadas como do complexo *M. tuberculosis*, 70 (87,5%) foram identificadas como *M. bovis*.

5.5.1 Tipagem molecular por MIRU-VNTR

Todas amostras anteriormente identificadas como sendo MTBC (80 isolados) foram submetidas a genotipagem pelo método do MIRU-VNTR *typing* usando 24-locus e em seguida foi realizada a análise e interpretação usando o site <http://www.MIRU-VNTRplus.org>. Foram identificados três complexos clonais e cinco *singletons* usando o método *minimum spanning tree* e 31 agrupamentos que variam de 2 a 43 membros e 15 agrupamentos individuais foram formados usando o método UPGMA.

Os loci mais variáveis foram os MIRU 10 (960), QUB-26 (4052) e Miru 26 (2996), com variabilidade alélica entre 0,45 a 0,72. Os loci com variabilidade intermédia (0,35 a 0,39) foram MIRU 16 (1644), MIRU 24 (2687), MIRU 27(3007), ETR-A (2165) e Mtub 29 (2347). Os loci MIRU 02 (154), MIRU 31 (3192) e MIRU 40 (802), e Mtub 4 (424), Mtub 30 (2401), Mtub 34 (3171) e Mtub 39 (3690) são os que não apresentaram nenhuma variação. Vinte isolados (25%) não tiveram resultados consistentes para análise no MIRU-VNTR.

A Figura 3 ilustra os agrupamentos formados com base nos perfis de MIRU-VNTR usando 24 locus.

Figura 3 - Agrupamentos formados com base nos perfis de MIRU-VNTR

Fonte: Inlamea, 2018.

A Figura 4 representa o dendograma do MIRU-VNTR usando 24 locus de 50 isolados.

Figura 4 - Dendograma demonstrando árvore filogenética dos padrões de MIRU VNTR de *M. bovis*

Fonte: Inlamea, 2018.

5.5.2 Tipagem molecular por *spoligotyping*

Foram identificados cinco padrões de spoligotyping (*Mbovis.org* *Mycobacterium bovis* *Spoligotype Database* www.mbovis.org) em 70 isolados analisados.

O perfil SB0961 (28/45) foi o mais prevalente e o que se encontra mais distribuído em Moçambique, seguido do padrão SB0140 (11/45). Os dois padrões estão igualmente presentes nas cinco províncias representadas. O perfil SB2481 foi identificado como sendo o padrão exclusivo do sul do país. Este padrão foi identificado no presente estudo como um novo padrão e cadastrado no banco de dados M.bovis.org com a seguinte característica: OCTcode: 676772177777600; HEXcode: 6F-5F-51-7F-FF 60; BINcode:110111110111111010001111111111111111100000.

O padrão SB1099 foi identificado como padrão único no presente estudo.

O poder de discriminação da técnica *spoligotyping* foi de 0,58 nas amostras analisadas.

O spolDB identificou o spolDB 683 como pertencente à família *Bov-2* e quatro padrões órfãos pertencentes à família *Bov* e um à família *M. bovis* BCG.

A Figura 5 - representa os padrões de *spoligotyping* de 45 isolados.

Figura 5 – Frequência dos padrões de *spoligotyping* identificados

Perfil	Número SB	N	Porcentagem
	SB0961	28	62%
	SB0140	10	22%
	SB2306	3	7%
	SB2481	3	7%
	SB1099	1	2%

Fonte: Inlamea, 2018.

O distrito de Machanga na província de Sofala foi o que apresentou maior diversidade (quatro dos cinco padrões identificados) em relação aos padrões identificados.

A Figura 6 representa o mapeamento e distribuição dos perfis de *spoligotyping* dos isolados de *M. bovis*.

Figura 6. Mapeamento e distribuição dos perfis de *spoligotyping*

Fonte: Inlamea, 2018.

5. 5. 3 Comparação de MIRU-VNTR e *Spoligotyping*

Na comparação das duas técnicas de tipagem podemos notar que dentro do mesmo padrão de *spoligotyping* são apresentados vários perfis de MIRU-VNTR, e podemos notar que o poder de discriminação do MIRU-VNTR é maior que o poder de discriminação do *spoligotyping*. Amostras de Manica possuem o mesmo perfil de *spoligotyping* e se encontram no mesmo agrupamento de MIRU-VNTR. Para alguns casos existe uma tendência de agrupamento próximo ao mesmo *spoligotyping*.

Figura 6 – Dendrograma comparando os resultados das análises com as técnicas de MIRU-VNTR e *spoligotyping*

UPOMA-Tree, MIRU-VNTR (24): Categorical (1), Spoligo: Categorical (1)

Fonte: Inlamea, 2017.

5.6 ANÁLISES DE COMPLEXOS CLONAIIS RD

Setenta (70) isolados identificados como *M. bovis* foram submetidas a PCRs específicos para analisar as regiões RD (RDAf1, RAf2, RDEu1 e RDEu2), responsáveis pelos complexos clonais. Destes, 18,5% (13/70) dos isolados foram compatíveis ao complexo clonal europeu 1 (Eu1) e todos os outros isolados não foram compatíveis a nenhum de complexos clonais descritos até hoje. Apenas 1 isolado apresentou assinatura compatível ao complexo clonal africano 1.

As amostras pertencentes ao complexo clonal EU1 apresentaram assinaturas compatíveis ao *spoligotyping* SB0140 com exceção de três amostras, que apresentam outro padrão de *spoligotyping*.

5.7 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

No presente estudo 24 isolados foram submetidos a identificação por PRA PCR, onde 10 (42%) isolados foram identificados como sendo MNT com predomínio de *M. noncrhomogenicum* seguido de *M. abscessus*. Em 10 (42%) isolados não foi possível a identificação da espécie e 16% dos isolados foi compatível ao MTBC.

A tabela 5 apresentam as espécies de MNT isoladas e sua frequência.

Tabela 5 – Frequências das espécies de MNT isoladas nas lesões sugestivas de bTB

Espécies	Número de isolados	Porcentagem
<i>M. noncrhomogenicum</i>	4	16,7
<i>M. abscessus</i>	2	8,3
<i>M. fortuitum</i>	1	4,2
<i>M. gordonae</i>	1	4,2
<i>M. terrae</i>	1	4,2
<i>M. conspicuum</i>	1	4,2
Não identificadas	14	58,3
Total	24	100

Fonte: Inlamea, 2018.

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS PRODUTIVOS DE BOVINOS NO SUL DE MOÇAMBIQUE

Embora se pense que os sistemas produtivos tradicionais de bovinos na África não contribuem significativamente para geração de receitas, esses sistemas são responsáveis por uma boa parte do PIB dos países, apesar da diferença de natureza agroecológica (ANTENEH, 1989). Em Moçambique, a agricultura em geral contribui com cerca de 24,77% do PIB nacional, e a produção de bovinos de corte desempenha papel importante no setor agrícola, contribuindo com 14,8% do PIB do setor agrícola e 4,4% com o PIB total (FAO, 2005). Segundo Anteneh (1989) nos sistemas pastoris da África cerca de 50-60% da produção de gado é comercializada, e entre 35 e 65% da produção de gado é comercializada nas regiões mais úmidas e altas da África subsaariana onde a produção de gado é realizada concomitantemente com a prática da agricultura. Esses dados corroboram com os nossos achados, onde a pecuária foi classificada como a primeira atividade que fornece rendimentos a 52,7% dos inquiridos.

Em Moçambique, o gado bovino extensivo fornece aos agricultores o método mais eficiente de utilização das forragens cultivadas a partir de pastagens, florestas e resíduos vegetais, que são convertidos em proteína animal de alto valor biológico (ESCRIVÃO, 2012). Além da carne, o gado criado de forma extensiva também contribui para o sustento familiar através do leite, trabalho, transporte e prestígio social familiar. Cerca de 75% dos criadores do setor familiar ou tradicional possuem até 28 animais, com média de 23 animais do rebanho. Ainda, 96% (734/764) dos criadores possuem gado bovino da raça Landim e o número de criadores que possuem gado da raça Brahman é reduzido. Em Moçambique, os criadores comerciais de bovinos de corte e os de pequenos produtores possuem animais das raças Landim e Brahman ou cruzamentos entre os dois. Poucos criadores comerciais possuem raças especializadas para a produção de leite - Holstein Friesian e Jersey (MACHADO, 2015).

A cadeia de comercialização de bovinos envolve pequenos intermediários que adquirem animais de pequenos criadores perfazendo um rebanho e esses são engordados ou não e posteriormente levados aos abatedouros. O rebanho que

chega ao abatedouro normalmente possui animais de propriedades diferentes e/ou regiões diferentes.

Pelos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que a maior parte das explorações pecuárias do sul de Moçambique é extensiva, tipo familiar ou tradicional, voltada para a subsistência, embora vendam os animais para suprir as necessidades cotidianas e a maior fonte de entrada e saída de animais são as cerimônias tradicionais. O prestígio social e imobilizado inativo são as principais motivações para a prática da pecuária. Os animais são criados de forma extensiva com utilização de pastagens naturais em áreas de pastoreio comunitário, sem investimento em manejos reprodutivo e sanitário e sem assistência veterinária.

6.2 PREVALÊNCIA DA TUBERCULOSE BOVINA NOS ABATEDOUROS DE MAPUTO

Com base na inspeção *post mortem* realizada em Maputo e Machava abatedouros de bovinos em Moçambique, a prevalência da condenação de carcaças com lesões sugestivas de bTB no período de outubro de 2016 a outubro de 2017 foi de 0,63% (83/13127). Estudos semelhantes, realizados em outros países africanos, relatam prevalências muito diferentes. Na Tanzânia, foram relatadas prevalências de 0,18%, 0,46% e 19,8%, respectivamente por Awah Ndukum et al. (2010) e Cleaveland et al. (2007). No Chad, Diguimbaye-Djaibé et al. (2006), reportaram prevalência de 7,3% (737/10000). Sanou et al. (2014), na Burkina Faso, observaram prevalência de 6,74% (101/1499). Habarugira et al. (2014), no Rwanda acharam prevalência de 0,9% (148/16753) e Bhembe et al. (2017) encontraram prevalência de 2,5 (373/14950) na África de sul.

Outros estudos similares, porém, utilizando amostragem, reportaram os seguintes resultados: 5,7% (17/300) e 6,12% (63/1029) na Etiópia, reportadas por Pal et al. (2017) e Aylate e et al. (2013) respectivamente, 5% (154/2886) em Gana (Atiadeve et al., 2014), 15% (120/800) na Nigéria por Saidu et al. (2015) e de 7,4% na Zâmbia (24/1680) por Munyeme et al. (2012).

O padrão de distribuição de lesões, envolvendo linfonodos da cabeça, tórax e membros e sempre envolvendo os pulmões, foi similar ao encontrado por Maxlhuza et al. (2014) em Moçambique. Saibu et al. (2015) na Nigéria encontraram padrão de distribuição de lesões idênticos aos nossos achados. Os resultados do

presente estudo mostram que 80% das carcaças condenadas apresentavam lesões sugestivas de bTB disseminada pelos órgãos e linfonodos, não existiam sinais clínicos evidentes da doença. A predominância de carcaças com lesões generalizadas significa alto risco de exposição de animais e humanos, sobretudo das populações rurais que têm estreito contato com esses animais. Esse risco é ampliado em função da alta prevalência de HIV positivos no país.

Uma vez que o cálculo da prevalência foi baseado nos registros oficiais nota-se que há uma subnotificação das lesões sugestiva de tuberculose encontrada no abatedouro de Machava aos serviços de veterinária. Dos 15 casos ocorridos na inspeção detalhada com coleta de amostras foram notificados apenas cinco casos ao serviço oficial. A prevalência estimada de lesões sugestivas de bTB na inspeção de rotina no abatedouro de Machava foi de 0,60% (5/827) e submetida a registros oficiais e à inspeção realizada paralelamente no presente estudo foi de 1,81% (15/827). Nota-se que cerca de 10 amostras com lesões sugestivas de bTB não foram reportadas. A capacidade inadequada e a falta de rigor da equipe veterinária em realizar a inspeção de carne desempenham papel importante na detecção de casos. No entanto, a carga de trabalho, tempo e diligência do inspetor que realiza são fundamentais para a detecção de lesões de TB bovina em particular, acrescido a falta de estrutura das instalações (CORNER et al., 1990; SHITAYE et al., 2006; AWAH NDUKUM et al., 2010; BIFFA et al., 2010). Segundo Biffa et al. (2010). Houve um aumento de 10,1% das carcaças positivas na inspeção minuciosa, quando comparado com a inspeção de rotina.

Esses dados sugerem que entre os países africanos e também entre regiões de um mesmo país, existem diferenças importantes em relação a situação epidemiológica da tuberculose bovina e que a região estudada de Moçambique apresenta prevalências relativamente baixas. Os dados de condenação de carcaças em abatedouros são indicadores importantes da situação epidemiológica da tuberculose bovina, porém apresentam algumas restrições, sobretudo em países onde os serviços veterinários oficiais são precários. Dentre estes pode-se destacar o abate informal, que significa a ausência de informações sanitárias sobre determinada parcela da população. Assim, o ideal seria que esses países estimassem a prevalência da tuberculose bovina com base em estudos transversais, com sólido planejamento amostral e utilização de testes indiretos de diagnóstico. Contudo, a vigilância em abatedouros pode servir como fonte de informação

epidemiológica e vigilância passiva das regiões onde este são implantados, e servir de ponte entre diagnósticos laboratoriais e os diagnósticos de campo, principalmente em países com escassos recursos.

Importante salientar que durante o período de outubro de 2016 a abril de 2017, no presente estudo foi identificado número maior de carcaças com lesões sugestivas de tuberculose do que o serviço oficial moçambicano. Tal resultado significa que os inspetores oficiais precisam de treinamento para melhorar sua capacidade de detecção de lesões.

6.3 CULTURA E ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA

Cerca de 83% (143/172) das lesões sugestivas de tuberculose bovina apresentaram isolamento bacteriano compatível do gênero *Mycobacterium*. Entretanto, Sanou et al. (2014) isolaram 47,5% das lesões sugestivas (48/101). O uso de meios de cultura específicos, como Stonebrink, mostrou aumentar a recuperação e a taxa de isolamento e, conseqüentemente, a qualidade do DNA obtido desses isolados. Neste estudo, 56% (80/143) foram identificadas como membros do MTBC e 7% como MNT.

6.4 TIPAGEM MOLECULAR POR MIRU-VNTR

A comparação da diversidade de loci de MIRU-VNTR tem sido questionada devido a não utilização de conjuntos de loci padronizados assim, é comum a escolha de loci idênticos que são em menor quantidade do que o conjunto utilizado nos estudos individuais (MACHADO et al., 2018). Por este motivo, a comparação eficiente só pode ser possível se o número de loci e os loci escolhidos forem idênticos.

Os MIRU 10, MIRU 26, QUB 26, apresentaram maior variabilidade, com diversidades alélicas variando de 0,72 a 0,45. Machado et al. (2018), em estudo em Moçambique utilizando 24 loci identificaram o ETR-A, MIRU 24, MIRU 27 e Mtub 29 como os de maior variabilidade em conjunto o MIRU 26, QUB 26 que também foram identificados no presente estudo. Os loci MIRU 2, MIRU 20, MIRU 31 e MIRU 40, e Mtub 4, Mtub 30, Mtub 34, Mtub 39 e QUB 11b não apresentaram variação em todos

os isolados analisados. No entanto, Machado et al. (2018), identificaram o MIRU 2, MIRU 4, MIRU 10, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 31, Mtub 34 Mtub39, ETR-B e QUB 4156 como os sem nenhuma variabilidade em todos isolados. Apenas 5 loci (MIRU 2, 20, 31, Mtub 34, 39) foram comuns em ambos estudos. Os MIRU 16, 24, 27, ETR-A e Mtub 29 apresentaram uma diversidade alélica média variando de 0,35 a 0,39.

Ao comparar os resultados com estudos similares realizados em Moçambique e na África Austral em países transfronteiriços com Moçambique. Os achados deste estudo foram contundentes com os de Machado et al. (2018), que foi realizado em Moçambique nos quais MIRU 26, e QUB26 foram identificados como os de maior diversidade alélica, ao contrário dos estudos realizados na Tanzânia por Katale et al. (2017), na Zâmbia por Malama et al (2014). Por lado, Hlokwe et al. (2013), obtiveram na África do Sul, o Miru 10, com moderada diversidade e os MIRU16, MIRU26 e QUB26 com alta diversidade. Os loci MIRU 16, MIRU 26 e QUB 26 são suficientemente variáveis para serem usados como marcadores de estirpes de Moçambique e África do Sul, uma vez que são os únicos loci que apresentam alta variabilidade nos três estudos. Estes resultados sugerem a possibilidade de existirem ou terem existido fluxos constante de estirpes da África do Sul para Moçambique, também referida por Machado e et al. (2018).

O locus MIRU 10 foi identificado por Machado et al. (2018) sem nenhuma variabilidade em 59 isolados. Porém, em 50 isolados o mesmo teve uma diversidade alélica de 0,45, completamente oposto ao estudo anterior. Autores indicam os loci QUBs (QUB11b, QUB26, QUB4156) como os que possuem maior polimorfismo, porém, no presente estudo não foi verificado. Por esta razão, eles não são informativos na questão epidemiológica em Moçambique, contrariamente a Tanzânia (KATALE et al., 2017).

Hill et al. (2012) não verificaram diferenças na formação de agrupamentos de MTBC usando MTS baseado no MIRU-VNTR tanto 12 ou 24 loci em isolados humanos e sugerem que 12 loci seriam suficientes para discriminar estirpes de MTBC. Por outro lado, para Hill et al. (2012), estirpe ou espécies com elevadas cópias de IS6110 eram beneficiadas na formação de agrupamentos. *M. bovis* apresenta poucas cópias de IS6110 (THIERRY et al., 1990). No entanto, o número de loci sem variabilidade ou variabilidade média questionam o poder de discriminação quando a utilização de número e a escolha de loci. Entre tanto, Liu et al. (2014) comparando os MST baseados tanto *spoligotyping* como no MIRU-VNTR

na linhagem *Beijing* em humanos concluíram os de MIRU tem alta capacidade de discriminação.

Podemos concluir que a seleção de loci para minimizar a relação custo-efetividade, na África deve levar em consideração as diferenças regionais de loci com alto poder de discriminação. Em Moçambique a inclusão dos loci MIRU 10, MIRU 16, MIRU 26 e QUB 26 pode tornar a técnica de MIRU-VNTR mais discriminatória mesmo reduzindo o número total de loci a utilizar.

6.5 TIPAGEM MOLECULAR POR *SPOLIGOTYPING*

Todos os cinco perfis de *spoligotyping* identificados apresentaram características compatíveis com *M. bovis*, com ausência dos espaçadores 3, 9, 16 e 39 a 43, que também é assinatura de *M. bovis* linhagem vacinal BCG identificado na base de dados como SB0120 (SMITH et al., 2011). Houve o predomínio do padrão SB0961, distribuído por toda região de estudo. O perfil SB0961 é semelhante a *M. bovis* BCG identificado no complexo clonal como “*BCG Like*” (MÜLLER et al., 2009). Estes dados são consistentes com os achados por Machado et al., (2018), onde mais da metade dos isolados foram identificados como perfil SB0961. Das cinco províncias analisadas neste estudo o perfil SB0961 foi encontrada em todas. O *spoligotyping* SB0961 (28 isolados), juntamente com SB2306 (3 isolados), são chamados de derivados de BCG por possuírem padrão de deleção idêntico ao do SB0120 (espaçador 3, 9, 16 e 39-43) com variações de um ou mais espaçadores deletados desde que não seja compatível ao complexo clonal africano 1, africano 2 ou europeu 1 (MÜLLER et al., 2009; SMITH et al., 2011).

O perfil SB0140 foi identificado como segundo mais frequente. Este perfil encontra-se disseminado tanto no sul como no centro do país e em todos sistemas produtivos. Em contraste Machado et al. (2018), evidenciaram que o perfil limitava-se apenas a região sul do país e com predomínio de unidades do setor comercial. De acordo com Zimpel (2017), o perfil de *spoligotyping* SB0140 era o mais sequenciado dos genomas de *M. bovis* depositados nos genbank até 2017. Este perfil foi descrito em diversos países com frequência variável desde baixa a alta. Na América Latina foi descrito como bastante prevalente na Argentina, Brasil, Chile, México, Paraguai, Uruguai, França, Irlanda, Itália, Reino Unido, África do Sul e

Austrália (SMITH, 2012; ROCHA et al., 2013b; ZUMÁRRAGA et al., 2013; SANDOVAL-AZUARA et al., 2017).

A introdução do perfil SB0140 em alguns países foi relacionado com a importação de raças bovinas britânicas (ZUMÁRRAGA et al., 2013; GARBACCIO et al., 2014). A disseminação deste perfil foi relacionada com proximidade e acordos comerciais na área de pecuária entre os países importadores direto do Reino Unido e os circunvizinhos, como Argentina e Brasil (ZIMPEL et al., 2017). Moçambique e África do Sul partilham uma fronteira terrestre bastante extensa que possibilita a movimentação de animais devido ao comércio, mas também em cerimônias tradicionais ou trocas devido a relações sociais principalmente nos distritos fronteiriços. Este fato demonstra claramente o argumento de que as fronteiras políticas na África não constituem barreiras físicas para movimentação de animais e suas doenças. Isto é evidenciado no estudo de bTB e brucelose no Parque Nacional de Limpopo (TANNER et al., 2014). Por outro lado, a importação de bovinos da África do Sul parece ser uma hipótese bastante sólida para a disseminação do padrão SB0140. Segundo Machado (2015), evidências encontradas nos relatórios anuais de serviços de veterinária apontaram para importação de bovinos das colônias britânicas (Zâmbia, Zimbábue e Malawi) incluindo África do Sul para Moçambique nos anos cinquenta. Numa análise filogenética elaborada por Machado et al. (2018), os isolados de Moçambique apresentam-se como sendo sub-ramos de clado sul africano.

O perfil SB1099 foi identificado em um isolado (2%) proveniente da província de Sofala. Em Moçambique, este padrão já tinha sido descrito por Machado et al. (2018) na província de Niassa (Norte), Manica (Centro) e na província de Inhambane (Sul). Na África, foi descrito em humano na Nigéria por Lawson et al. (2012), em bovinos no Chad e Nigéria por Müller et al. (2009), e nos Camarões por Koro et al. (2015). Este perfil foi relacionado ao complexo clonal africano que é comum no centro-oeste da África (MÜLLER et al., 2009).

Um novo perfil de *spoligotyping* foi identificado no presente estudo e submetido a base de dados M.bovis.org com a designação SB2481, exclusivo do sul de Moçambique em raio de 100 km entre os distritos de Chibuto e Chicumbane. Este perfil também possui assinatura para os chamados derivados de BCG (caso do padrão de deleção de SB0120 acrescido de outras deleções). A identificação deste novo padrão levanta várias hipóteses sobre a circulação de animais e a diversidade

genética dos isolados em Moçambique. Por um lado, a cadeia de comercialização de animais envolve intermediários que compram animais em pequenos criadores e os transportam para regiões onde são vendidos para outros comerciantes, que podem ou não criar estes animais e por fim enviá-los para abate em nome do último comprador (dados não publicados). Por outro lado, a movimentação de animais sem o conhecimento de status sanitários dos animais ocorre em resultado de cerimônias tradicionais (TANNER et al., 2014). Em relação a diversidade genética, a identificação de um padrão novo levanta a hipótese de que mais padrões autóctones de Moçambique ainda estão por ser identificados. Segundo Egbe (2017), a diversidade de *spoligotyping* únicos na África é bastante alta e a falta de amostragem suficiente em outros países fez com que este fato não estivesse evidenciado quando fez um estudo abrangente sobre esta temática.

Machado et al. (2018) identificaram nove perfis de *spoligotyping* nunca descritos em 178 isolados estudados. Com exceção do SB2481, todos *spoligotyping* (SB0961, SB0140, SB1099, SB2306) descritos neste trabalho já tinham sido achados num estudo anterior realizado por Machado.

A diversidade de isolados de *M. bovis* em Moçambique não parece ser causada apenas por recentes introduções ao território, mas provavelmente é mantida dentro dos reservatórios em cada região particular. Embora exista uma forte associação entre características genéticas de *M. bovis* e geografia, a identificação de um clado com característica própria dos isolados de Moçambique corrobora com essa hipótese (MACHADO et al., 2018). O distrito de Machanga é o que apresentou maior diversidade genética das estirpes de *M. bovis* seguido do distrito de Govuro. Os relatos de tuberculose bovina nestes distritos são bastante antigos e a tuberculose humana pode ter uma contribuição do *M. bovis*, como visto nos achados de Viegas (2015), em que foi encontrado um padrão compatível com o SB0961 em casos de linfadenite tuberculosa. A diversidade genética dos isolados *M. tuberculosis* em Moçambique é bastante extensa sendo já descrito pelo menos seis linhagens (VIEGAS et al., 2010; VIEGAS, 2015).

Segundo a base de dados da SITIVIT spolDB foram identificados 11 perfis spolDB 683 pertencente à família Bov-2 e 28 padrões órfãos pertence à família Bov e 1 a família *M. bovis* BCG e outros não foram identificados.

6.6 COMPARAÇÃO DE DISCRIMINAÇÃO DE ISOLADOS DE MTBC POR MIRU-VNTR E *SPOLIGOTYPING*

Cinco perfis foram identificados com base na técnica de *spoligotyping* contra os 47 perfis identificados pelo MIRU-VNTR. Foram usados o mesmo número de isolados para comparar as duas técnicas de discriminação molecular. No entanto, O poder de discriminação do *spoligotyping* foi de 0,58. Por sua vez, Machado et al. (2018) em 178 isolados de Moçambique, o poder de discriminação encontrando pelo *spoligotyping* foi de 0,59, semelhante ao obtido no presente estudo. O poder de discriminação do MIRU-VNTR pode variar entre país, região geográfica ou cenários epidemiológicos, porém, não houve variabilidade quando comparamos com o estudo realizado por Machado et al. (2018). Quando comparado com o *spoligotyping*, o MIRU-VNTR apresentou maior poder de discriminação, estes resultados sugerem a circulação de estirpes que não podem ser diferenciadas apenas usando o *spoligotyping* sugestivo de evolução clonal. Dentro do mesmo *spoligotyping* vários padrões de MIRU-VNTR foram identificados e no mesmo loci a variabilidade na mesma região foi quase mínima.

Estirpes com diferentes padrões MIRU-VNTR provavelmente representam estirpes geneticamente distintas, mas as estirpes com o mesmo tipo de MIRU-VNTR representam estirpes filogeneticamente próximas. Segundo Machado (2015), a diversidade dos padrões MIRU-VNTR dentro do mesmo *spoligotyping* mostram que o *spoligotyping* por si só não é suficiente para os estudos de transmissão de bTB, mas sugerem ligações epidemiológicas. Assim, a utilização combinada de MIRU-VNTR e *spoligotyping* aumenta significativamente o poder de discriminação das duas técnicas e as ilações epidemiológicas.

6.7 COMPLEXO CLONAL DAS ESTIRPES DE *M. bovis*

As estirpes de *M. bovis* podem ser agrupadas em quatro linhagens de acordo com as assinaturas que definem os complexos clonais proposto por Smith (2012), que sugere a evolução clonal das estirpes de *M. bovis* geograficamente relacionadas ou não. Atualmente, mais dois complexos clonais hipotéticos foram descritos, mas não sendo usualmente aceite. Existe uma correlação entre o complexo clonal e o padrão de *spoligotyping*. No entanto, variações do padrão de

spoligotyping dentro de cada complexo clonal podem ocorrer (MÜLLER et al., 2009; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012; SMITH, 2012).

As estirpes BCG derivadas são as mais prevalentes em Moçambique, estando presente do norte ao sul segundo Machado e colaboradores (2018), os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os achados de Machado et al (2018) e Smith et al. (SMITH, 2012), onde as estirpes BCG derivado são comuns. Este padrão BCG derivado é o mais prevalente na Europa continental bem como no norte de África e acredita-se que tenha sido introduzido devido a importação de animais vindo da Europa, porém, a localização em ramos diferentes na árvore filogenética das estirpes BCG derivados de Moçambique e Zâmbia sustentam a hipótese de duas fontes distintas de introdução (MACHADO et al., 2018). Este grupo está relacionado com os *spoligotyping* que possuem a deleções parecidas ao do BCG como o caso do SB0961, este perfil também foi isolado pois embora com baixa frequência na República Tcheca, Eslováquia Pavlik et al, (2002) e na Argentina (GARBACCIO et al., 2014; SHIMIZU et al., 2014)

Os treze isolados identificados como do complexo clonal europeu 1 apresentaram o perfil SB0140, Estes resultados são compatíveis com os achados de Machados e colaboradores (2018). O perfil SB0140 está relacionado com o complexo clonal europeu 1 que é o mais disseminado e encontra-se distribuído principalmente nas colônias britânicas, incluindo África do Sul (SMITH et al., 2011; SMITH, 2012). No entanto, no presente trabalho nem todas amostras com o perfil de *spoligotyping* SB0140 foram compatíveis com o complexo clonal europeu 1.

O padrão SB1099 possui uma deleção no espaçador 30 que é característico do complexo clonal africano 1, pois embora tenha permanecido intacto (MÜLLER et al., 2009). Um isolado do centro do País apresentou este *spoligotyping*, mas não foi identificado o complexo clonal. Estes corroboram com os achados por Machado (2015), que também não conseguiu identificar o complexo clonal do perfil SB1099. O complexo clonal africano 1 é bastante controverso, sendo mais definido pela localização geográfica dos isolados com a assinatura do *spoligotyping* do que propriamente a assinatura, este complexo está geograficamente associado com a região oeste-centro africana (MÜLLER et al., 2009; SMITH, 2012; MACHADO, 2015).

Nenhum isolado se apresentou compatível ao complexo clonal africano 2. Resultados consistentes com os de Machado e Colaboradores (2018). O complexo

clonal africano 2 pode estar presente em baixa prevalência na região norte de Moçambique onde os países vizinhos já identificaram este complexo (MACHADO, 2015).

A localização geográfica específica de determinados complexos clonais pode levantar vários questionamentos sobre a epidemiologia da doença incluindo a sua disseminação, contrariando os argumentos de Smith et al (SMITH, 2012), onde os complexos clonais estão intimamente ligados a geografia. Esta hipótese pode ser sustentada pela identificação incomum de complexo clonal europeu 2 em uma amostra do Brasil (ZIMPEL et al., 2017).

O número de isolados identificados no presente estudo (50/70) não foram identificados em nenhum complexo clonal descrito atualmente. Este fato sugere a existência de linhagens que ainda não foram descritas ou agrupadas em algum complexo clonal. Segundo Zimpel (2017), este fato permite questionar se o padrão de investigação dos complexos clonais representa ou não todas as estirpes, sendo necessário a revisão deste critério. Por outro lado, duas amostras com o padrão SB0140 não foram compatíveis com o complexo clonal europeu 1. Segundo Zimpel (2017), os *spoligotypings* não podem ser usados como características únicas para essa categorização, para além de que os estudos usados para categorização foram bastante limitantes.

6.8 IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Estudos sobre o isolamento de MNT a partir de fontes animais ainda são escassos, tanto em animais de abatedouros quanto em animais selvagens, se comparado ao *M. bovis* (KAZWALA et al., 1998; TSCHOPP et al., 2010).

Diferentes espécies de micobactérias foram isoladas nas lesões compatíveis com tuberculose bovina com base em biologia molecular com recurso ao PCR de restrição enzimática. No presente estudo, 5% de todas lesões (10/158) foram identificadas como MNT. Em algumas regiões da África a prevalência de MNT em lesões sugestivas a bTB de carcaças em abatedouros atinge 40%, entretanto, Sanou et al. (2014), em Burkina Faso identificaram 4% (2/48) dos isolados.

No presente estudo, seis diferentes espécies de MNT foram identificadas e duas infecções mistas entre MNT e MTBC incluindo *M. bovis*. Com certeza, esses achados evidenciam a importância das MNT com micobactérias oportunistas e sua

importância para saúde pública (BOLAÑOS et al., 2018). Segundo Botha et al. (2013), a diversidade das espécies de MNT causando lesões é alta. O número de espécies identificadas está relacionado ao número de isolados submetidos para identificação. No presente estudo 24 isolados foram submetidos a identificação por PRA e 10 (42%) foram identificados como MNT. Por outro lado, em 10 isolados não se firmou o diagnóstico, uma vez que as bandas na restrição enzimática pela enzima *Hae* não estavam nítidas, porém todas amostras submetidas ao gene *hsp-65* e para enzima *BstEII* foram positivas. Estes resultados descartam a possibilidade destes isolados serem de *Nocardia* spp. (MURICY et al., 2014).

Houve predomínio de *M. nonchromogenicum* com 16,7% dos isolados totais (4/24). Berg et al. (2009) identificaram o predomínio de *M. nonchromogenicum* em isolados de lesões sugestivas de bTB em abatedouro na Etiópia, por sua vez, Gcebe et al (2013) identificaram *M. nonchromogenicum* como um dos mais prevalentes em isolados de solo, água, lesões de búfalos e bovinos na África do Sul. Diguimbaye et al (2006), no Chad, identificaram o *M. nonchromogenicum*, *M. fortuitum* e MAC como os mais prevalentes nos isolados bovinos e humanos.

M. abscessus que foi o segundo mais prevalente no presente estudo (8,3%). Na Ásia, foi considerada a segunda MNT clinicamente relevante responsável por doenças pulmonares (SIMONS et al., 2011). Na Tanzânia, *M. abscessus* foi relatado causando doenças em humanos (KATALE et al., 2014), e na África do Sul foi descrito em animais incluindo animais selvagens (BOTHÁ; GEY VAN PITTIUS; VAN HELDEN, 2013; GCEBE et al., 2013).

Dois isolados submetidos ao PRA apresentaram-se compatíveis com infecções mistas entre MNT e MTBC incluindo *M. bovis*. Relatos de infecções mistas de amostras de tecido animais sugerem fontes diferentes de infecção (GCEBE; HLOKWE, 2017). Alguns autores levantam a possibilidade de contaminação ambiental. No entanto, pode haver infecções mistas de origem ambiental. Na infecção mista foi identificado *M. conspicuum*, pouco se sabe em relação a essa espécie e a possibilidade de causar lesões ou doenças em bovinos. Nos humanos já foi relacionado em pacientes com imunodeficiência causando infecção pulmonar. Em termos fenótipos são semelhantes ao *M. bovis* (SPRINGER et al., 1995).

No presente estudo foram também identificadas *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. terrae* e *M. conspicuum* embora em menor frequência, representando 4,2% (1/24) dos isolados totais. Gcebe et al (2013) identificaram para além do *M.*

nonchromogenicum, complexo de *M. fortuitum*, complexo de *M. avium* e *M. gordonae* como espécies mais frequente. Tschopp et al. (2010) identificaram *M. terrae* bastante prevalente nas espécies selvagens na Etiópia, enquanto Kazwala et al. (1998), bem como Katale et al. (2017) identificaram nos isolados de bovinos na Tanzânia. Gcebe et al. (2013), sugerem que *M. nonchromogenicum* e *M. terrae* sejam espécies de MNT mais pervasivas na África, embora as prevalências diferem nos países. Em conjunto com *M. triviale*, *M. nonchromogenicum* e *M. terrae* formam complexo *M. terrae* que foi relatado como causador de doenças crônicas com resistência aos antimicrobianos em animais e humanos (TORTOLI et al., 2013).

Diguimbaye-Djaibé et al. (2006), identificaram *M. fortuitum* como a mais prevalente das MNT em lesões sugestivas de bTB em animais abatidos no Chad e também em humanos. Em Moçambique, *M. fortuitum* já foi reportado causando infecção em pacientes com HIV (NUNES et al., 2008) e, recentemente, foi identificado como uma das três MNT ligadas a alta taxa de infecção por MNT nos casos de tuberculose humana (embora sem significância clínica) em crianças na área rural de Moçambique (LÓPEZ-VARELA et al., 2017). As crianças órfãs e vulneráveis na maioria das vezes são responsáveis pelo pastoreio de animais. Durante as longas horas de pastoreio utilizam o leite dos animais potencialmente infectado para se alimentar. Machado et al (2018) isolaram *M. bovis* de amostras de leite em Moçambique e Kazwala et al (1998), isolaram MNT de leite cru nas condições de campo na Tanzânia.

A não identificação de espécies MNT tem sido grande problema nas amostras de lesões ou outros tipos amostras. Gcebe et al (2017), não conseguiram identificar cerca de 8% dos isolados (8/91) de lesões sugestivas de bTB. Pode estar na origem desta falta de identificação a utilização de métodos de biologia molecular bem como as bases de dados de *Mycobacterium* que não tem sido atualizada (PRA <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). No entanto, a utilização do sequenciamento genômico e metagenômica bem como a redução do custo por amostras dessas novas tecnologias usadas irão contribuir para melhor identificação das MNT.

Este é o primeiro relato e descrição das MNT relacionado com a bTB em Moçambique. É possível concluir que a alta prevalência de MNT causando lesões típicas sugestivas de tuberculose bovina alertam para a importância dessas MNT como fonte de infecção para a bTB, bem como provável interferência na resposta aos testes de tuberculinização utilizados no diagnóstico da bTB. Essa alta

prevalência possibilita a transmissão da tuberculose zoonótica por MNT devido ao aumento da infecção por MNT em pacientes com HIV e aumento de resistência aos antimicrobianos usados no tratamento da tuberculose humana.

7 CONCLUSÕES

A atividade pecuária é a mais importante para a metade dos produtores rurais moçambicanos.

Os dados de abatedouros sugerem que a prevalência da tuberculose bovina em Moçambique está entre as mais baixas dos países africanos.

Há necessidade de treinamento dos veterinários dos serviços de inspeção moçambicanos para melhorar sua capacidade de detecção de carcaças com lesões sugestivas de tuberculose.

Os dados de condenação de carcaças em abatedouros são indicadores importantes da situação epidemiológica da tuberculose bovina e risco para saúde pública.

Para os isolados de *M. bovis* estudados, o MIRU-VNTR apresentou maior poder de discriminação do que o *spoligotyping*.

Os loci mais variáveis foram os MIRU 10 (960), QUB-26(4052) e Miru 26 (2996) e podem ser incluídos para discriminar estirpes de Moçambique.

Foram identificados cinco padrões de *spoligotyping* e o SB0961 foi o mais prevalente. O padrão SB2481, exclusivo do sul do país, foi identificado como um novo padrão e registrado no banco de dados M.bovis.org.

O distrito de Machanga apresentou maior diversidade de isolados de *M. bovis* e o Govuro maior número de isolados de *M. bovis*.

A diversidade das MNT ligadas a lesões sugestivas de bTB é alta e as lesões por elas causadas são similares a infecção por MTBC.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, P.; ROMERO, B.; VICENTE, J.; CARACAPPA, S.; GALLUZZO, P.; MARINEO, S.; VICARI, D.; TORINA, A.; CASAL, C.; DE LA FUENTE, J.; GORTAZAR, C. Tuberculosis Epidemiology in Islands: Insularity, Hosts and Trade. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071074>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

AKALU, B. Review on Epidemiology of Bovine Tuberculosis in Ethiopia. **Academic Journal of Animal Diseases**, v. 6, n. 3, p. 57–66, 2017.

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

AMENI, G.; ERKIHUN, A. Bovine tuberculosis on small-scale dairy farms in Adama Town, central Ethiopia, and farmer awareness of the disease. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 26, n. 3, p. 711–9, 2007.

AMENI, G.; TADESSE, K.; HAILU, E.; DERESSE, Y.; MEDHIN, G.; ASEFFA, A.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M.; BERG, S. Transmission of Mycobacterium tuberculosis between Farmers and Cattle in Central Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

ANTENEH, A. Livestock and food production in Africa: challenge and opportunity for the national livestock and veterinary services *. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz**, v. 8, n. 3, p. 591–606, 1989. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/d8352.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

ARANAZ, A.; LIÉ BANA, E.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZOLEZ, O.; RODRIGUEZ-FERRI, E. F.; BUNSCHOTEN, A. E.; VAN EMBDEN, J. D. A.; COUSINS, D. Spacer Oligonucleotide Typing of Mycobacterium bovis Strains from Cattle and Other Animals: a Tool for Studying Epidemiology of Tuberculosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2734–2740, 1996.

AWAH NDUKUM, J.; KUDI, A. C.; BRADLEY, G.; ANE-ANYANGWE, I. N.; FONTEBUG, S.; TCHOUMBOUE, J. Prevalence of bovine tuberculosis in abattoirs of the littoral and Western highland regions of cameroon: a cause for public health concern. **Veterinary medicine international**, v. 2010, p. 495015, 8 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20613999>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

AYELE, W. Y.; NEILL, S. D.; ZINSSTAG, J.; WEISS, M. G.; PAVLIK, I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 8, p. 924–937, 2004.

AYLATE, A.; SHAH, S. N.; ALEME, H.; GIZAW, T. T. Bovine Tuberculosis: Prevalence and Diagnostic Efficacy of Routine Meat Inspection Procedure in Woldiya Municipality Abattoir North Wollo Zone, Ethiopia. **Tropical animal health and production**, v. 45, n. 3, p. 855–864, mar. 2013.

BASTIDA, F.; JUSTE, R. A. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. **Journal of immune based therapies and vaccines**, v. 9, p. 8, 31 out. 2011.

BAUER, J.; ANDERSEN, Å. B.; KREMER, K.; HÅKAN, A.; RNER, M. Usefulness of Spoligotyping To Discriminate IS6110 Low-Copy- Number Mycobacterium tuberculosis Complex Strains Cultured in Denmark. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 37, n. 8, p. 2602–2606, 1999.

BERG, S.; FIRDESSA, R.; HABTAMU, M.; GADISA, E.; MENGISTU, A.; YAMUAH, L.; AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ROBERTSON, B. D.; SMITH, N. H.; ENGERS, H.; YOUNG, D.; HEWINSON, R. G.; ASEFFA, A.; GORDON, S. V. The burden of mycobacterial disease in Ethiopian cattle: Implications for public health. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. e5068, 2009.

BERG, S.; GARCIA-PELAYO, M. C.; MÜLLER, B.; HAILU, E.; ASIIMWE, B.; KREMER, K.; DALE, J.; BONIOTTI, M. B.; RODRIGUEZ, S.; HILTY, M.; RIGOUTS, L.; FIRDESSA, R.; MACHADO, A.; MUCAVELE, C.; NGANDOLO, B. N. R.; BRUCHFELD, J.; BOSCHIROLI, L.; MÜLLER, A.; SAHRAOUI, N.; PACCIARINI, M.; CADMUS, S.; JOLOBA, M.; VAN SOOLINGEN, D.; MICHEL, A. L.; DJØNNE, B.; ARANAZ, A.; ZINSSTAG, J.; VAN HELDEN, P.; PORTAELS, F.; KAZWALA, R.; KÄLLENIUS, G.; HEWINSON, R. G.; ASEFFA, A.; GORDON, S. V.; SMITH, N. H. African 2, a clonal complex of Mycobacterium bovis epidemiologically important in East Africa. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 3, p. 670–678, 2011.

BHEMBE, N. L.; JAJA, I. F.; NWODO, U. U.; OKOH, A. I.; GREEN, E. Prevalence of tuberculous lymphadenitis in slaughtered cattle in Eastern Cape, South Africa. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 27–37, 1 ago. 2017.

BIET, F.; BOSCHIROLI, M. L.; THOREL, M. F.; GUILLOTEAU, L. A. Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC). **411 Vet. Res**, v. 36, p. 411–436, 2005.

BIFFA, D.; SKJERVE, E.; OLOYA, J.; BOGALE, A.; ABEBE, F.; DAHLE, U.; BOHLIN, J.; DJØNNE, B. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from Ethiopian cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 6, 2010.

BOLAÑOS, C. A. D.; FRANCO, M. M. J.; SOUZA FILHO, A. F.; IKUTA, C. Y.; BURBANO-ROSETO, E. M.; FERREIRA NETO, J. S.; HEINEMANN, M. B.; MOTTA, R. G.; PAULA, C. L. de; MORAIS, A. B. C. de; GUERRA, S. T.; ALVES, A. C.; LISTONI, F. J. P.; RIBEIRO, M. G. Nontuberculous mycobacteria in milk from positive cows in the intradermal comparative cervical tuberculin test: implications for human tuberculosis infections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, n. 0, 15 fev. 2018.

BOTHA, L.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; VAN HELDEN, P. D. Mycobacteria and disease in Southern Africa. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. SUPPL1, p. 147–156, 2013.

BOUKARY, A. R.; THYS, E.; ABATIH, E.; GAMATIÉ, D.; ANGO, I.; YENIKOYE, A.; SAEGERMAN, C. Bovine tuberculosis prevalence survey on cattle in the rural livestock system of Torodi (Niger). **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

BRANDT, L.; FEINO CUNHA, J.; WEINREICH OLSEN, A.; CHILIMA, B.; HIRSCH, P.; APPELBERG, R.; ANDERSEN, P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 672–8, fev. 2002.

BRENNAN, M. J.; DELOGU, G. The PE multigene family: a “molecular mantra” for mycobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 246–249, maio 2002.

BROOKS-POLLOCK, E.; KEELING, M. Herd size and bovine tuberculosis persistence in cattle farms in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 92, n. 4, p. 360–365, dez. 2009.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; 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 SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684–9, 19 mar. 2002.

CARRUTH, L.; ROESS, A. A.; MEKONNEN, Y. T.; MELAKU, S. K.; NICHTER, M.; SALMAN, M. Zoonotic tuberculosis in Africa: challenges and ways forward. **The**

Lancet, v. 388, n. 10059, p. 2460–2461, 2016.

CAYROU, C.; TURENNE, C.; BEHR, M. A.; DRANCOURT, M. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. **Microbiology**, v. 156, p. 687–694, 2010.

CLEAVELAND, S.; LAURENSEN, M. K.; TAYLOR, L. H. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 356, n. 1411, p. 991–9, 29 jul. 2001.

CLEAVELAND, S.; SHAW, D. J.; MFINANGA, S. G.; SHIRIMA, G.; KAZWALA, R. R.; EBLATE, E.; SHARP, M. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: Risk factors for infection in human and cattle populations. **Tuberculosis**, v. 87, n. 1, p. 30–43, 2007.

COETZER, J. A. .; THOMSON, G. .; TUSTIN, R. . General introduction of *Mycobacteria*. In: **Infectious Diseases of Livestock**. 2nd Revised ed. Goodwood: Oxford University Press Southern Africa, 2005.

COMAS, I.; HOMOLKA, S.; NIEMANN, S.; GAGNEUX, S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7815, 12 nov. 2009.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1–2, p. 53–63, 1 maio 1994.

CORNER, L.; MELVILLE, L.; MCCUBBIN, K.; SMALL, K. J.; MCCORMICK, B. S.; WOOD, P. R.; ROTHEL, J. S. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. **Australian veterinary journal**, v. 67, n. 11, p. 389–392, 1990.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. a; HUCHZERMEYER, H. F.; DE KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 59–70, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

COSIVI, O.; MESLIN, F. X.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 14,

n. 3, p. 733–746, 1995.

COUSINS, D.; WILLIAMS, S.; LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; BUNSCHOTEN, A.; VAN EMBDEN, J.; ELLIS, T. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 1, p. 168–78, jan. 1998.

COVERT, T. C.; RODGERS, M. R.; REYES, A. L.; STELMA, G. N. Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 65, n. 6, p. 2492–2496, 1999.

DE GARINE-WICHATITSKY, M.; CARON, A.; GOMO, C.; FOGGIN, C.; DUTLOW, K.; PFUKENYI, D.; LANE, E.; LE BEL, S.; HOFMEYR, M.; HLOKWE, T.; MICHEL, A. Bovine tuberculosis in buffaloes, Southern Africa. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 5, p. 884–5, maio 2010.

DE GARINE-WICHATITSKY, M.; CARON, A.; KOCK, R.; TSCHOPP, R.; MUNYEME, M.; HOFMEYR, M.; MICHEL, A. A review of bovine tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in sub-Saharan Africa. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 7, p. 1342–1356, 2013.

DEJENE, S. W. **Eco-epidemiology of Bovine Tuberculosis (bTB) in an African Savanna**. 2017. Wageningen University, 2017. Disponível em: <<http://edepot.wur.nl/420891>>.

DEJENE, S. W.; A HEITKÖNIG, I. M.; T PRINS, H. H.; LEMMA, F. A.; MEKONNEN, D. A.; ALEMU, Z. E.; KELKAY, T. Z.; DE BOER, W. F. Risk Factors for Bovine Tuberculosis (bTB) in Cattle in Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159083>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

DIGUIMBAYE-DJAIBÉ, C.; VINCENT, V.; SCHELLING, E.; HILTY, M.; NGANDOLO, R.; MAHAMAT, H. H.; PFYFFER, G.; BAGGI, F.; TANNER, M.; ZINSSTAG, J. Species identification of non-tuberculous mycobacteria from humans and cattle of Chad. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 148, p. 251–256, 2006.

DOS VULTOS, T.; MESTRE, O.; RAUZIER, J.; GOLEC, M.; RASTOGI, N.; RASOLOFO, V.; TONJUM, T.; SOLA, C.; MATIC, I.; GICQUEL, B. Evolution and Diversity of Clonal Bacteria: The Paradigm of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1538, 6 fev. 2008.

DREWE, J. A.; FOOTE, A. K.; SUTCLIFFE, R. L.; PEARCE, G. P. Pathology of *Mycobacterium bovis* Infection in Wild Meerkats (*Suricata suricatta*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, p. 12–24, 2009.

DUARTE, E. L.; DOMINGOS, M.; ALBUQUERQUE, T.; AMADO, A.; BOTELHO, A. Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de *Mycobacterium bovis* de uma exploração no Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 102, p. 563–564, 2007.

EGBE, N. F.; MUWONGE, A.; NDIP, L.; KELLY, R. F.; SANDER, M.; TANYA, V.; NGWA, V. N.; HANDEL, I. G.; NOVAK, A.; NGANDALO, R.; MAZERI, S.; MORGAN, K. L.; ASUQUO, A.; DE C. BRONSVOORT, B. M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Cameroon. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4652, 5 dez. 2017.

ESCRIVÃO, R. J. A. **Effects of body condition, body weight and calf removal on productive and reproductive characteristics of extensive beef cattle in Mozambique**. 2012. University of Pretoria, 2012. Disponível em: <<https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/27814/Complete.pdf?sequence=7&isAllowed=y>>.

ETTER, E.; DONADO, P.; JORI, F.; CARON, A.; GOUTARD, F.; ROGER, F. **Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of Infection by Nontuberculous *Mycobacteria*. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 9, n. 2, p. 177–215, 1996.

FAO. Animal feed resources for small-scale livestock producers. (J. A. Kategile, A. N. Said, B. H. Dzowela, Eds.) In: second Pastures Network for Eastern and Southern Africa workshop, Nairobi. **Anais...** Nairobi: IDRC Manuscript Report, 1985. Disponível em: <<https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/49993/x5548e.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

GAGNEUX, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, 19 fev. 2018.

GALAGAN, J. E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 5, p. 307–320, 25 maio 2014.

GARBACCIO, S.; MACIAS, A.; SHIMIZU, E.; PAOLICCHI, F.; PEZZONE, N.; MAGNANO, G.; ZAPATA, L.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; PEYRU, M.; CAIMI, K.; ZUMÁRRAGA, M.; CANAL, A.; CATALDI, A. Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. **Virulence**, v. 5, n. 2, p. 297–302, 15 fev. 2014.

GARCÍA-BASTEIRO, A. L.; MIRANDA RIBEIRO, R.; BREW, J.; SACOOR, C.; VALENCIA, S.; BULO, H.; COBELENS, F.; MACETE, E. Tuberculosis on the rise in southern Mozambique (1997–2012). **European Respiratory Journal**, v. 49, n. 3, p. 1601683, 22 mar. 2017.

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 Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 7877–7882, 2003.

GCEBE, N.; HLOKWE, T. M. Non-tuberculous *Mycobacteria* in South African Wildlife: Neglected Pathogens and Potential Impediments for Bovine Tuberculosis Diagnosis. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, v. 7, n. 7, p. 153389–15, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00015>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

GCEBE, N.; RUTTEN, V.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; MICHEL, A. Prevalence and distribution of non-tuberculous mycobacteria (NTM) in cattle, African buffaloes (*syncerus caffer*) and their environments in South Africa. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. SUPPL1, p. 74–84, 2013.

GEY VAN PITTIUS, N. C.; SAMPSON, S. L.; LEE, H.; KIM, Y.; VAN HELDEN, P. D.; WARREN, R. M. Evolutionary Biology Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 6, 2006.

GOMO, C. **A survey of Tuberculosis and Brucellosis in wild and domestic animals in the South-East Lowveld of Zimbabwe**. 2011. University of Zimbabwe, 2011. Disponível em: <http://ir.uz.ac.zw/bitstream/handle/10646/1231/Gomo_A_Survey_of_Tuberculosis_body.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em: 6 fev. 2018.

GONZALO-ASENSIO, J.; MALAGA, W.; PAWLIK, A.; ASTARIE-DEQUEKER, C.; PASSEMAR, C.; MOREAU, F.; LAVAL, F.; DAFFÉ, M.; MARTIN, C.; BROSCHE, R.; GUILHOT, C.; DAFFE, M.; MARTIN, C.; BROSCHE, R.; GUILHOT, C. Evolutionary

history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 31, p. 11491–11496, 2014.

GOPINATH, K.; SINGH, S. Non-Tuberculous Mycobacteria in TB-Endemic Countries : Are We Neglecting the Danger ? v. 4, n. 4, p. 1–4, 2010.

GORI, A.; ESPOSTI, A. D.; BANDERA, A.; MEZZETTI, M.; SOLA, C.; MARCHETTI, G.; FERRARIO, G.; SALERNO, F.; GOYAL, M.; DIAZ, R.; GAZZOLA, L.; CODECASA, L.; PENATI, V.; RASTOGI, N.; MORONI, M.; FRANZETTI, F. Comparison between spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphisms in molecular genotyping analysis of Mycobacterium tuberculosis strains. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 4, p. 236–244, ago. 2005.

GORMLEY, E.; CORNER, L. A. L.; COSTELLO, E.; RODRIGUEZ-CAMPOS, S. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of Mycobacterium bovis and Mycobacterium caprae. **Research in Veterinary Science**, n. 97, p. 30–43, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.010>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S. M.; HORSBURGH, R.; HUITT, G.; IADEMARCO, M. F.; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; FORDHAM VON REYN, C.; WALLACE, R. J.; WINTHROP, K. American Thoracic Society Documents An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. 2007.

HABARUGIRA, G.; RUKELIBUGA, J.; NANYINGI, M. O.; MUSHONGA, B. Bovine Tuberculosis in Rwanda: Prevalence and Economic Impact Evaluation by Meat Inspection at Société Des Abattoirs de Nyabugogo-Nyabugogo Abattoir, Kigali. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 85, n. 1, p. 1–5, 2014.

HILL, V. R.; ZOZIO, T.; SADIKALAY, S.; VIEGAS, S.; STREIT, E.; KALLENIUS, G.; RASTOGI, N.; MANGANELLI, R. MLVA Based Classification of Mycobacterium tuberculosis Complex Lineages for a Robust Phylogeographic Snapshot of Its Worldwide Molecular Diversity. v. 7, n. 9, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041991>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

HIRSH, D.; BIBERSTEIN, E. Mycobacterium. In: WALKER, R. L.; HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J. (Ed.). **Veterinary Microbiology**. 2nd. ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 536.

HLOKWE, T. M.; VAN HELDEN, P.; MICHEL, A. Evaluation of the Discriminatory Power of Variable Number of Tandem Repeat Typing of Mycobacterium Bovis Isolates from Southern Africa. **Transboundary and emerging diseases**, v. 60 Suppl 1, p. 111–120, nov. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/tbed.12096>>.

HORSBURGH, C. R.; SELIK, R. M. The Epidemiology of Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infection in the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). **American Review of Respiratory Disease**, v. 139, n. 1, p. 4–7, 1989. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/139.1.4>>.

HUARD, R. C.; CLAUDIO, L.; LAZZARINI, D. O.; BUTLER, W. R.; SOOLINGEN, D. Van; HO, J. L. PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the. **Society**, v. 41, n. 4, p. 1637–1650, 2003.

IKUTA, C. Y.; MORATO, F.; DE SOUZA, G. O.; HEINEMANN, M. B.; AMAKU, M.; NETO, J. S. F. Influence of the incubation conditions on culture media to optimize primary isolation of Mycobacterium bovis. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3693–3700, 2016.

INANGOLET, F. O.; DEMELASH, B.; OLOYA, J.; OPUDA-ASIBO, J.; SKJERVE, E. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in the transhumant and agro-pastoral cattle herds in the border areas of Katakwi and Moroto districts, Uganda. **Tropical Animal Health and Production**, v. 40, n. 7, p. 501–508, 22 out. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11250-007-9126-x>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

INTERNATIONAL MONETARY FUND. **Republic of Mozambique and the IMF**. Disponível em: <<http://www.imf.org/en/Countries/MOZ>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

JAHNKE, H. E. **Livestock Production Systems and Livestock Development in Tropical Africa**. Kiel: Kieler Wissenschaftsverlag Vauk, 1982.

JUSTE, R. A.; ALONSO-HEARN, M.; MOLINA, E.; GEIJO, M.; VAZQUEZ, P.; SEVILLA, I. A.; GARRIDO, J. M. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. **BMC research notes**, v. 2, p. 233, 22 nov. 2009.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907–14, abr. 1997.

KATALE, B. Z.; MBUGI, E. V.; SIAME, K. K.; KEYYU, J. D.; KENDALL, S.; KAZWALA, R. R.; DOCKRELL, H. M.; FYUMAGWA, R. D.; MICHEL, A. L.; RWEYEMAMU, M.; STREICHER, E. M.; WARREN, R. M.; VAN HELDEN, P.; MATEE, M. I. Isolation and Potential for Transmission of *Mycobacterium bovis* at Human–livestock–wildlife Interface of the Serengeti Ecosystem, Northern Tanzania. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 3, p. 815–825, 2017.

KATALE, B. Z.; MBUGI, E. V.; BOTHA, L.; KEYYU, J. D.; KENDALL, S.; DOCKRELL, H. M.; MICHEL, A. L.; KAZWALA, R. R.; RWEYEMAMU, M. M.; VAN HELDEN, P.; MATEE, M. I. Species diversity of non-tuberculous mycobacteria isolated from humans, livestock and wildlife in the Serengeti ecosystem, Tanzania. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 616, 18 nov. 2014.

KATALE, B. Z.; MBUGI, E. V.; KARIMURIBO, E. D.; KEYYU, J. D.; KENDALL, S.; KIBIKI, G. S.; GODFREY-FAUSSETT, P.; MICHEL, A. L.; KAZWALA, R. R.; VAN HELDEN, P.; MATEE, M. I. Prevalence and risk factors for infection of bovine tuberculosis in indigenous cattle in the Serengeti ecosystem, Tanzania. **BMC veterinary research**, n. 9, p. 267–1746, 2013.

KAZWALA, R. R.; DABORN, C. J.; KUSILUKA, L. J. M.; JIWA, S. F. H.; SHARP, J. M.; KAMBARAGE, D. M. Isolation of *Mycobacterium* Species From Raw Milk of Pastoral Cattle of the Southern Highlands of Tanzania. **Tropical Animal Health & Production**, v. 30, n. 4, p. 233–239, 1998.

KORO, F. K.; NGATCHOU, A. F.; PORTAL, J. L.; GUTIERREZ, C.; ETOA, F.-X.; EYANGO, S. I. The genetic population structure of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at the Yaoundé and Douala abattoirs in Cameroon. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz**, v. 34, n. 3, p. 1001–1010, 2015.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MART, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, A. J. D. A. Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 37, n. 8, p. 2607–2618, 1999.

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MULLER, E. E.; POESTER, F. P.; CAVALLÉRO, J. C. M.; NETO, J. S. F.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Ministério de agricultura pecuaria e abastecimento Brasil, p. 188, 2006

LAWSON, L.; ZHANG, J.; GOMGNIMBOU, M. K.; ABDURRAHMAN, S. T.; LE MOULLEC, S.; MOHAMED, F.; UZOEWULU, G. N.; SOGAOLU, O. M.; GOH, K. S.; EMENYONU, N.; REFRÉGIER, G.; CUEVAS, L. E.; SOLA, C. A molecular epidemiological and genetic diversity study of tuberculosis in Ibadan, Nnewi and Abuja, Nigeria. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38409, 2012.

LIU, Y.; TIAN, M.; WANG, X.; WEI, R.; XING, Q.; MA, T.; JIANG, X.; LI, W.; ZHANG, Z.; XUE, Y.; ZHANG, X.; WANG, W.; WANG, T.; HONG, F.; ZHANG, J.; WANG, S.; LI, C. Genotypic diversity analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains collected from Beijing in 2009, using spoligotyping and VNTR typing. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106787, 2014.

LÓPEZ-VARELA, E.; L. GARCÍA-BASTEIRO, A.; AUGUSTO, O. J.; FRAILE, O.; BULO, H.; IRA, T.; GONDO, K.; VAN INGEN, J.; NANICHE, D.; SACARLAL, J.; ALONSO, P. L. High Rates of Non-Tuberculous *Mycobacteria* Isolation in Mozambican Children with Presumptive Tuberculosis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169757, 17 jan. 2017.

MACHADO, A. **Mapping of the distribution of *Mycobacterium bovis* strains involved in bovine tuberculosis in Mozambique**. 2015. Stellenbosch University, 2015. Disponível em: <<http://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/98114>>.

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.; VAN HELDEN, P.; CORREIA-NEVES, M. Genetic diversity and potential routes of transmission of *Mycobacterium bovis* in Mozambique. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006147, 18 jan. 2018.

MACUCULE, B. **Study of the prevalence of bovine tuberculosis in Govuro District , Inhambane Province, Mozambique**. 2009. University of Pretoria, 2009. Disponível em:<<https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/22937/dissertation.pdf?sequence=1>>.

MALAMA, S.; JOHANSEN, T. B.; MUMA, J. B.; MUNYEME, M.; MBULO, G.; MUWONGE, A.; DJONNE, B.; GODFROID, J. Characterization of *Mycobacterium Bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. **Veterinary medicine international**, v. 2014, p. 187842, 2014.

MARTÍN-CASABONA, N.; BAHRMAND, A. R.; BENNEDSEN, J.; THOMSEN, V. Ø.; CURCIO, M.; FELDMAN, K.; HAVELKOVA, M.; KATILA, M.; KÖKSALAN, K.;

PEREIRA, M. F.; RODRIGUES, F.; PFYFFER, G. E.; PORTAELS, F.; URGELL, J. R.; GROUP, S.; MYCOBACTERIA, N.; TORTOLI, E.; VINCENT, V.; WATT, B. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation . A multi-country retrospective survey. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 8, n. 10, p. 1186–1193, 2004.

MAXLHUZA, G.; MACHADO, A.; TANNER, M.; MOSER, I. Diagnosis of bovine tuberculosis in Mozambique Comparison of diagnostic methods. (VISAVET, Ed.) In: VI International M.bovis Conference, Cardiff. **Anais...** Cardiff: SP, 2014. Disponível em: <[https://www.bcva.eu/system/files/resources/Diagnosis of bovine tuberculosis in Mozambique.pdf](https://www.bcva.eu/system/files/resources/Diagnosis%20of%20bovine%20tuberculosis%20in%20Mozambique.pdf)>. Acesso em: 26 mar. 2018.

MBUGI, E. V.; KATALE, B. Z.; STREICHER, E. M.; KEYYU, J. D.; KENDALL, S. L.; DOCKRELL, H. M.; MICHEL, A. L.; RWEYEMAMU, M. M.; WARREN, R. M.; MATEE, M. I.; VAN HELDEN, P. D.; COUVIN, D.; RASTOGI, N. Mapping of Mycobacterium tuberculosis Complex Genetic Diversity Profiles in Tanzania and Other African Countries. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0154571, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154571>>.

MEDEIROS, L. dos S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LILENBAUM, W. Potential Application of New Diagnostic Methods for Controlling Bovine Tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 531–541, jul. 2010.

MEDEIROS, L.; MARASSI, C. D.; DUARTE, R. S.; DA SILVA, M. G.; LILENBAUM, W. Comparison of Decontamination Methods for Primary Isolation of Mycobacterium Bovis in Paucibacillary Bovine Tissues. **Letters in applied microbiology**, v. 54, n. 3, p. 182–186, mar. 2012.

MENDES, A. M. A Criação de Serviços Pecuários em Moçambique The beginning of the Moçambique Veterinary Services. p. 167–177, 2004.

MICHEL, A. L. L.; COOPER, D.; JOOSTE, J.; DE KLERK, L.-M.; JOLLES, A.; KLERK, L. De; JOLLES, A. Approaches towards optimising the gamma interferon assay for diagnosing Mycobacterium bovis infection in African buffalo (Syncerus caffer). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 2–3, p. 142–151, fev. 2011.

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

MOIANE, I.; MACHADO, A.; SANTOS, N.; NHAMBIR, A.; INLAMEA, O.; HATTENDORF, J.; KÄLLENIUS, G.; ZINSSTAG, J.; CORREIA-NEVES, M. Prevalence of bovine tuberculosis and risk factor assessment in cattle in rural

livestock areas of Govuro district in the southeast of Mozambique. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091527>>.

MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1–2, p. 153–177, maio 1994.

MOSTOWY, S.; COUSINS, D.; BRINKMAN, J.; ARANAZ, A.; BEHR, M. A. Genomic Deletions Suggest a Phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, p. 74–80, 2002.

MOSTOWY, S.; INWALD, J.; GORDON, S.; MARTIN, C.; WARREN, R.; KREMER, K.; COUSINS, D.; BEHR, M. A. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 18, p. 6386–95, set. 2005.

MUCAVELE, C. **Diversidade genética de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com tuberculose nos distritos de Buzi e Manhica, em Moçambique**. 2008. Universidade Técnica de Lisboa, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.5/970>>.

MÜLLER, B.; DÜRR, S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; LAISSE, C. J. M.; PARSONS, S. D. C.; HELDEN, P. D. van; ZINSSTAG, J. Zoonotic *Mycobacterium bovis* - induced tuberculosis in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 899–908, 2013.

MÜLLER, B.; HILTY, M.; BERG, S.; GARCIA-PELAYO, M. C.; DALE, J.; BOSCHIROLI, M. L.; CADMUS, S.; NGANDOLO, B. N. R.; GODREUIL, S.; DIGUIMBAYE-DJAIBÉ, C.; KAZWALA, R.; BONFOH, B.; NJANPOP-LAFOURCADE, B. M.; SAHRAOUI, N.; GUETARNI, D.; ASEFFA, A.; MEKONNEN, M. H.; RAZANAMPARANY, V. R.; RAMAROKOTO, H.; DJØNNE, B.; OLOYA, J.; MACHADO, A.; MUCAVELE, C.; SKJERVE, E.; PORTAELS, F.; RIGOUTS, L.; MICHEL, A.; MÜLLER, A.; KÄLLENIUS, G.; VAN HELDEN, P. D.; HEWINSON, R. G.; ZINSSTAG, J.; GORDON, S. V.; SMITH, N. H. African 1, an epidemiologically important clonal complex of *mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1951–1960, 2009.

MUNYEME, M.; MUMA, J. B.; MUNANG'ANDU, H. M.; KANKYA, C.; SKJERVE, E.; TRYLAND, M. Cattle owners' awareness of bovine tuberculosis in high and low prevalence settings of the wildlife-livestock interface areas in Zambia. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 1, p. 21, 20 abr. 2010.

MUNYEME, M.; MUMA, J. B.; SKJERVE, E.; NAMBOTA, A. M.; PHIRI, I. G. K.;

SAMUI, K. L.; DORNY, P.; TRYLAND, M. Risk factors associated with bovine tuberculosis in traditional cattle of the livestock/wildlife interface areas in the Kafue basin of Zambia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, p. 317–328, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.03.006>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

MUNYEME, M.; MUNANG'ANDU, H. M.; NAMBOTA, A.; MUMA, J. B.; PHIRI, A. M.; NALUBAMBA, K. S. The Nexus between Bovine Tuberculosis and Fasciolosis Infections in Cattle of the Kafue Basin Ecosystem in Zambia: Implications on Abattoir Surveillance. **Veterinary Medicine International**, v. 2012, p. 1–6, 10 nov. 2012.

MURICY, E. C. M.; LEMES, R. A.; BOMBARDA, S.; FERRAZOLI, L.; CHIMARA, E. Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: Critical aspects for bacteriological diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 397–401, set. 2014.

MWAKAPUJA, R. S.; MAKONDO, Z. E.; MALAKALINGA, J.; MOSER, I.; KAZWALA, R. R.; TANNER, M. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from pastoral livestock at Mikumi-Selous ecosystem in the eastern Tanzania. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 668–674, 1 nov. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.08.002>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

NGEOW, Y. F.; WONG, Y. L.; TAN, J. L.; HONG, K. W.; NG, H. F.; ONG, B. L.; CHAN, K. G. Identification of New Genospecies in the *Mycobacterium terrae* Complex. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0120789, 1 abr. 2015.

NUNES, E. A.; DE CAPITANI, E. M.; COELHO, E.; PANUNTO, A. C.; JOAQUIM, O. A.; RAMOS, M. de C. Doença pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não-tuberculosas entre pacientes recém-diagnosticados como HIV positivos em Moçambique, África. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 10, p. 822–828, out. 2008.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, p. 1–46, 1 ago. 1995.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Paratuberculosis (Johne's disease). **OIE Terrestrial Manual**, v. Chapter 2., p. 276–291, 2008.

OIE. Bovine tuberculosis. In: OIE BIOLOGICAL STANDARDS COMMISSION (Ed.). **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Sixth Edit ed. Paris: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2009.

ORTIZ-PELAEZ, A.; PFEIFFER, D. U.; SOARES-MAGALHÃES, R. J.; GUITIAN, F. J. Use of social network analysis to characterize the pattern of animal movements in the initial phases of the 2001 foot and mouth disease (FMD) epidemic in the UK. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, p. 40–55, 2006.

OSOFSKY, S. A.; KOCK, R. A.; KOCK, M. D.; KALEMA-ZIKUSOKA, G.; GRAHN, R.; KARESH, W. B. **Building support for protected areas using a “One Health” perspective**. [s.l.] IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, 2005.

PAL, M. An Abattoir based Study on Bovine Tuberculosis in Debre Zeit, Ethiopia. **World’s Veterinary Journal**, v. 7, n. 3, p. 101–107, 2017.

PAVLIK, I.; DVORSKA, L.; BARTOS, M.; PARMOVA, I.; MELICHAREK, I.; JESENSKA, A.; HAVELKOVA, M.; SLOSAREK, M.; PUTOVA, I.; MARTIN, G.; ERLER, W.; KREMER, K.; SOOLINGEN, D. Van. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period 1965–2001 studied by spoligotyping. **Vet. Med. – Czech**, v. 47, n. 7, p. 181–194, 2002.

RENEWICK, A. R.; WHITE, P. C. L.; BENIGIS, R. G. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: A multi-species host-pathogen system. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 4, p. 529–540, 2007.

ROCHA, V. C. F.; DE FIGUEIREDO, S. C.; ROSALES, C. A. R.; DE HILDEBRAND E GRISI FILHO, J. H.; KEID, L. B.; SOARES, R. M.; FERREIRA NETO, J. S. Molecular Discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 1, p. 17–21, jan. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1035>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

ROCK, R. B.; SUTHERLAND, W. M.; BAKER, C.; WILLIAMS, D. N. Extrapulmonary tuberculosis among Somalis in Minnesota. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1434–1436, set. 2006.

RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; SCHÜRCH, A. C.; DALE, J.; LOHAN, A. J.; CUNHA, M. V.; BOTELHO, A.; CRUZ, K. De; BOSCHIROLI, 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. European 2 - A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 866–872, 2012.

RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; SMITH, N. H.; BONIOTTI, M. B.; ARANAZ, A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. S, p. S5–S19, 2014.

RODWELL, T. C.; KRIEK, N. P.; BENGIS, R. G.; WHYTE, I. J.; VILJOEN, P. C.; DE VOS, V.; BOYCE, W. M. Prevalence of Bovine Tuberculosis in African buffalo at Kruger National Park. **Journal of Wildlife Diseases Wildlife Disease Association**, v. 37, n. 2, p. 258–264, 2001.

RODWELL, T. C.; MOORE, M.; MOSER, K. S.; BRODINE, S. K.; STRATHDEE, S. A. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 6, p. 909–16, jun. 2008.

RYAN, T. J.; LIVINGSTONE, P. G.; RAMSEY, D. S. L.; DE LISLE, G. W.; NUGENT, G.; COLLINS, D. M.; BUDDLE, B. M. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: The experience from New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2–4, p. 211–219, fev. 2006.

SAIDU, A. S.; OKOLOCHA, E. C.; GAMAWA, A. A.; BABASHANI, M.; BAKARI, N. A. Occurrence and Distribution of Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium Bovis*) in Slaughtered Cattle in the Abattoirs of Bauchi State, Nigeria. **Veterinary world**, v. 8, n. 3, p. 432–437, mar. 2015.

SALA, A.; BORDES, P.; GENEVAUX, P. Multiple Toxin-Antitoxin Systems in *Mycobacterium tuberculosis*. **Toxins**, v. 6, p. 1002–1020, 2014.

SAMO GUDO, P.; CUNA, Z.; COELHO, E.; MAUNGATE, S.; BORRONI, E.; MIOTTO, P.; AHMADOVA, S.; BROUWER, M.; MIGLIORI, G. B.; ZIGNOL, M.; CIRILLO, D. M. Is multidrug-resistant tuberculosis on the rise in Mozambique? Results of a national drug resistance survey. **The European respiratory journal**, v. 38, n. 1, p. 222–4, 1 jul. 2011.

SANDOVAL-AZUARA, S. E.; MUÑIZ-SALAZAR, R.; PEREA-JACOBO, R.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; PERERA-ORTIZ, A.; LÓPEZ-VALENCIA, G.; BRAVO, D. M.; SANCHEZ-FLORES, A.; MIRANDA-GUZMÁN, D.; FLORES-LÓPEZ, C. A.; ZENTENO-CUEVAS, R.; LANIADO-LABORÍN, R.; DE LA CRUZ, F. L.; STUBER, T. P. Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* to obtain molecular fingerprints in human and cattle isolates from Baja California, Mexico. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 48–56, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.012>>.

SANOU, A.; TARNAGDA, Z.; KANYALA, E.; ZINGUÉ, D.; NOUCTARA, M.; GANAMÉ, Z.; COMBARY, A.; HIEN, H.; DEMBELE, M.; KABORE, A.; MEDA, N.; VAN DE PERRE, P.; NEVEU, D.; BAÑULS, A. L.; GODREUIL, S. Mycobacterium bovis in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3142, out. 2014.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H. M.; PALMER, M. V.; HARRIS, B. N.; ORLOSKI, K. A.; BUDDLE, B. M.; THACKER, T. C.; LYASHCHENKO, K. P.; WATERS, W. R. Bovine tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 4, p. 205–220, 2010.

SEO, S. N.; MENDELSON, R. Climate Change Impacts on Animal Husbandry in Africa: A Ricardian Analysis. **World Bank Policy Research Working Paper**, v. 4261, n. 9, p. 1–48, 2007.

SHIMIZU, E.; MACÍAS, A.; PAOLICCHI, F.; MAGNANO, G.; ZAPATA, L.; FERNÁNDEZ, A.; CANAL, A.; GARBACCIO, S.; CATALDI, A.; CAIMI, K.; ZUMÁRRAGA, M. Genotyping Mycobacterium Bovis from Cattle in the Central Pampas of Argentina: Temporal and Regional Trends. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 236–245, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0074-0276140292>>.

SHITAYE, J. E.; GETAHUN, B.; ALEMAYEHU, T.; SKORIC, M.; TREML, F.; FICTUM, P.; VRBAS, V.; PAVLIK, I. A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS6110 PCR examination of tissues with tuberculosis lesions in cattle in Europa. **Veterinarni Medicina**, v. 51, n. 11, p. 512–522, 2006.

SIMONS, S.; VAN INGEN, J.; HSUEH, P.-R.; VAN HUNG, N.; DEKHUIJZEN, P. N. R.; BOEREE, M. J.; VAN SOOLINGEN, D. Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Tract Infections, Eastern Asia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 343–349, mar. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid1703.100604>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; MCDOWELL, S. W. J. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinary medicine international**, p. 621210, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2012/621210>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

SMITH, D. S.; LINDHOLM-LEVY, P.; HUITT, G. A.; HEIFETS, L. B.; COOK, J. L. Mycobacterium terrae: Case Reports, Literature Review, and In Vitro Antibiotic

Susceptibility Testing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 444–453, 1 mar. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/313693>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

SMITH, N. H. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 857–865, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.007>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

SMITH, N. H.; BERG, S.; DALE, J.; ALLEN, A.; RODRIGUEZ, S.; ROMERO, B.; MATOS, F.; GHEBREMICHAEL, S.; KAROUI, C.; DONATI, C.; MACHADO, A. da C.; MUCAVELE, C.; KAZWALA, R. R.; HILTY, M.; CADMUS, S.; NGANDOLO, B. N. R.; HABTAMU, M.; OLOYA, J.; MULLER, A.; MILIAN-SUAZO, F.; ANDRIEVSKAIA, O.; PROJAHN, M.; BARANDIARÁN, S.; MACÍAS, A.; MÜLLER, B.; ZANINI, M. S.; IKUTA, C. Y.; RODRIGUEZ, C. A. R.; PINHEIRO, S. R.; FIGUEROA, A.; CHO, S. N.; MOSAVARI, N.; CHUANG, P. C.; JOU, R.; ZINSSTAG, J.; VAN SOOLINGEN, D.; COSTELLO, E.; ASEFFA, A.; PROAÑO-PEREZ, F.; PORTAELS, F.; RIGOUTS, L.; CATALDI, A. A.; COLLINS, D. M.; BOSCHIROLI, M. L.; HEWINSON, R. G.; NETO, J. S. F.; SURUJBALLI, O.; TADYON, K.; BOTELHO, A.; ZÁRRAGA, A. M.; BULLER, N.; SKUCE, R.; MICHEL, A.; ARANAZ, A.; GORDON, S. V.; JEON, B. Y.; KÄLLENIUS, G.; NIEMANN, S.; BONIOTTI, M. B.; VAN HELDEN, P. D.; HARRIS, B.; ZUMÁRRAGA, M. J.; KREMER, K. European 1: A globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 1340–1351, 2011.

SMITH, N. H.; GORDON, S. V.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; CLIFTON-HADLEY, R. S.; HEWINSON, R. G. Bottlenecks and broomsticks: The molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 670–681, 1 set. 2006a.

SMITH, N. H.; KREMER, K.; INWALD, J.; DALE, J.; DRISCOLL, J. R.; GORDON, S. V.; VAN SOOLINGEN, D.; GLYN HEWINSON, R.; MAYNARD SMITH, J. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Theoretical Biology**, v. 239, n. 2, p. 220–225, mar. 2006b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.08.036>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

SPRINGER, B.; TORTOLI, E.; RICHTER, I.; GRU, R.; SCH-GERDES, S. R. U.; USCHMANN, K.; SUTER, F.; COLLINS, M. D.; KROPPESTEDT, R. M.; BO, E. C. *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a New Species Isolated from Patients with Disseminated Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2805–2811, 1995.

SUNDER, S.; LANOTTE, P.; GODREUIL, S.; MARTIN, C.; BOSCHIROLI, M. L.; BESNIER, J. M. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. **Journal of clinical**

microbiology, v. 47, n. 4, p. 1249–51, abr. 2009.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RÜSCH-GERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; DE HAAS, P.; VAN DEUTEKOM, 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 SOOLINGEN, D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498–510, 1 dez. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; SOOLINGEN, D. Van; 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, n. 10, p. 3563–3571, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

SUPPLY, P.; WARREN, R. M.; BAÑULS, A.-L.; LESJEAN, S.; VAN DER SPUY, 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, n. 2, p. 529–538, 10 jan. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03315.x>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

SWAN, G. E.; KRIEK, N. P. J. Veterinary education in Africa: current and future perspectives. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 76, n. 1, p. 105–14, 2009.

TANNER, M.; INLAMEIA, O.; MICHEL, A.; MAXLHUZA, G.; PONDJA, A.; FAFETINE, J.; MACUCULE, B.; ZACARIAS, M.; MANGUELE, J.; MOIANE, I. C.; MARRANANGUMBE, A. S.; MULANDANE, F.; SCHÖNFELD, C.; MOSER, I.; VAN HELDEN, P.; MACHADO, A. Bovine Tuberculosis and Brucellosis in Cattle and African Buffalo in the Limpopo National Park, Mozambique. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 6, p. 632–638, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/tbed.12210>>.

TASLER, G. R. W.; HARTLEY, W. J. Foal Abortion Associated with *Mycobacterium terrae* Infection. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, p. 122–125, 26 jan. 1981.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTRGER, E. C.; BODMER, T. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain

Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 31, n. 2, p. 175–178, 1993.

TESEMA, C.; TADESSE, T.; GEBREHIWOT, M.; TSEGAW, A.; WELDEGEBREAL, F. Environmental and host-related determinants of tuberculosis in Metema district, north-west Ethiopia. **Drug, healthcare and patient safety**, v. 7, p. 87–95, 2015.

THIERRY, D.; BRISSON-NOËL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J.-L.; GICQUEL, B. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2668–2673, 1990.

THOEN, C. N. Mycobacterium. In: CARTER, G.; COLE, J. (Ed.). **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 1990. p. 620.

TORTOLI, E.; GITTI, Z.; KLENK, H. P.; LAURIA, S.; MANNINO, R.; MANTEGANI, P.; MARIOTTINI, A.; NEONAKIS, I. Survey of 150 strains belonging to the Mycobacterium terrae complex and description of Mycobacterium engbaekii sp. nov., Mycobacterium heraklionense sp. nov. and Mycobacterium longobardum sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART2, p. 401–411, 2013.

TSCHOPP, R.; ASEFFA, A.; SCHELLING, E.; BERG, S.; HAILU, E.; GADISA, E.; HABTAMU, M.; ARGAW, K.; ZINSSTAG, J. Bovine tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in Hamer Woreda, South Omo, Southern Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. 1–7, 2010.

VAN INGEN, J.; AL-HAJJOJ, S. A. M.; BOEREE, M.; AL-RABIAH, F.; ENAIMI, M.; DE ZWAAN, R.; TORTOLI, E.; DEKHUIJZEN, R.; VAN SOOLINGEN, D. Mycobacterium riyadhense sp. nov., a non-tuberculous species identified as Mycobacterium tuberculosis complex by a commercial line-probe assay. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1049–1053, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijs.0.005629-0>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

VAN SOOLINGEN, D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: Main methodologies and achievements. **Journal of Internal Medicine**, v. 249, n. 1, p. 1–26, 2001.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; GROENEN, P. M. A.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of Various Repetitive DNA Elements as Genetic Markers for Strain Differentiation and Epidemiology of Mycobacterium

tuberculosis. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 31, n. 8, p. 1987–1995, 1993.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; DE HAAS, P. E. W.; SOLL, D. R.; VAN EMBDEN, J. D. A. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in Mycobacterium tuberculosis Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2578–2586, 1991.

VIEGAS, S. O. **Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates in Mozambique**. 2015. Karolinska Institutet, 2015. Disponível em: <https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/40581/Lic_Sofia_Viegas.pdf?sequence=5>. Acesso em: 24 nov. 2017.

VIEGAS, S. O.; MACHADO, A.; GROENHEIT, R.; GHEBREMICHAEL, S.; PENNHAG, A.; GUDO, P. S.; CUNA, Z.; MIOTTO, P.; HILL, V.; MARRUFO, T.; CIRILLO, D. M.; RASTOGI, N.; KÄLLENIUS, G.; KOIVULA, T. Molecular diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mozambique. **BMC microbiology**, v. 10, p. 195, 2010.

WANG, J.; MCINTOSH, F.; RADOMSKI, N.; DEWAR, K.; SIMEONE, R.; ENNINGA, J.; BROSC, R.; ROCHA, E. P.; DÉ, F.; VEYRIER, R. J.; BEHR, M. A. Insights on the Emergence of Mycobacterium tuberculosis from the Analysis of Mycobacterium kansasii. **genome biol. evol**, v. 7, p. 856–870, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/gbe/evv035>>. Acesso em: 7 mar. 2018.

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. **INT J TUBERC LUNG DIS**, v. 10, n. 7, p. 818–822, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1152>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

WEIR, R. E.; BLACK, G. F.; NAZARETH, B.; FLOYD, S.; STENSON, S.; STANLEY, C.; BRANSON, K.; SICHALI, L.; CHAGULUKA, S. D.; DONOVAN, L.; CRAMPIN, A. C.; FINE, P. E. M.; DOCKRELL, H. M. The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacille Calmette Guérin vaccination in southern England and northern Malawi. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 3, p. 390–399, 1 dez. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2006.03222.x>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2016**. Genebra, Suíça, 214p, 2016.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2017**. Genebra, Suíça, 262p, 2016.

WHO; FAO; OIE. **Roadmap for zoonotic tuberculosis**. Genebra. 27p,: World Health Organization, 2017.

WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. **Genome Research**, v. 1, n. 4, p. 269–273, 1992.

ZHANG, Z.-Y.; SUN, Z.-Q.; WANG, Z.-L.; HU, H.-R.; WEN, Z.-L.; SONG, Y.-Z.; ZHAO, J.-W.; WANG, H.-H.; GUO, X.-K.; ZHANG, S.-L. Identification and pathogenicity analysis of a novel non-tuberculous mycobacterium clinical isolate with nine-antibiotic resistance. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 91–6, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03818.x>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

ZIMPEL, C. K. **Sequenciamento, anotação e análise do genoma completo de Mycobacterium bovis cepa SP38**. 2017. Universidade de São Paulo, 2017.

ZIMPEL, C. K.; BRANDÃO, P. E.; DE SOUZA FILHO, A. F.; DE SOUZA, R. F.; IKUTA, C. Y.; FERREIRA NETO, J. S.; CAMARGO, N. C. S.; HEINEMANN, M. B.; GUIMARÃES, A. M. S. Complete Genome Sequencing of Mycobacterium bovis SP38 and Comparative Genomics of Mycobacterium bovis and M. tuberculosis Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2389, 5 dez. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02389>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

ZUMÁRRAGA, M.; ARRIAGA, C.; BARANDIARAN, S.; COBOS-MARÍN, L.; DE WAARD, J.; ESTRADA-GARCIA, I.; FIGUEIREDO, T.; FIGUEROA, A.; GIMÉNEZ, F.; GOMES, H.; GONZALEZ-Y-MERCHAND, J.; MACÍAS, A.; MILIÁN-SUAZO, F.; RODRÍGUEZ, C.; SANTILLÁN, M.; SUFFYS, P.; ZÁRRAGA, A.; CATALDI, A. Understanding the relationship between Mycobacterium bovis spoligotypes from cattle in Latin American Countries. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 9–21, 1 fev. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.012>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Diferentes morfologias das colônias de MTBC

APÊNDICE B – diferentes géis dos MIRU-VNTR ilustrando os loci com maior diversidade e os que não apresentam diversidade.