

VIVIANNE CAMBUÍ FIGUEIREDO ROCHA

***Avaliação do Spoligotyping, MIRU-VNTR e Multispacer Sequence Typing
na discriminação de isolados autóctones de Mycobacterium bovis***

São Paulo
2013

VIVIANNE CAMBUÍ FIGUEIREDO ROCHA

**Avaliação do *Spoligotyping*, MIRU-VNTR e *Multispacer Sequence Typing*
na discriminação de isolados autóctones de *Mycobacterium bovis***

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo
2013

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.2887
FMVZ

Rocha, Vivianne Cambuí Figueiredo
Avaliação do *Spoligotyping*, MIRU-VNTR e *Multispacer Sequence Typing* na discriminação de isolados autóctones de *Mycobacterium bovis*. / Vivianne Cambuí Figueiredo Rocha. -- 2013.
75 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

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. Spoligotyping. 3. MIRU-VNTR. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

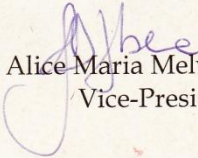
Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do *spoligotyping*, MIRU-VNTR e *multispacer sequence typing* na discriminação de isolados autóctones de *Mycobacterium bovis*", protocolado sob o nº 2125/2011, utilizando amostras isoladas de *Mycobacterium bovis* oriundas de bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. 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 em reunião de 16/03/2011.

We certify that the Research "Evaluation by *spoligotyping*, MIRU-VNTR, and *multispacer sequence typing* in the discrimination of *Mycobacterium bovis* autochthonous isolates", protocol number 2125/2011, under the responsibility Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 03/16/2011.

São Paulo, 18 de março de 2011


Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROCHA, Vivianne Cambuí Figueiredo

Título: Avaliação do *Spoligotyping*, MIRU-VNTR e *Multispacer Sequence Typing* na discriminação de isolados autóctones de *Mycobacterium bovis*

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: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado esposo, Salomão, minha mola propulsora em busca do conhecimento e crescimento profissional. Fonte de sabedoria e meu exemplo de luta e vitória. Com ele, todos os instantes são momentos de aprendizado, da oportunidade de enxergar o mundo de uma forma melhor.

Aos meus queridos pais, Euler e Rai, que desejam a minha felicidade incondicional, pelo contínuo apoio, tanto na vida profissional, quanto na pessoal. À minha irmã/mãe Nedy, por todo o apoio em qualquer instante e pelo carinho. À minha família, Vó Nenzinha, Tia Cleusa e Tia Nice, Tio Ademir e família, exemplos de dedicação. À Tia Cida e Thiago, representantes da minha família em São Paulo, que sempre me recebem com aconchego.

À minha família da Paraíba (S. Juvenal, D. Ana, Jailson, Ana Maria, Vó Socorro, Tia Dos Anjos, Tio Antônio e Artur), que me receberam não somente com os braços abertos, mas também com os corações. Que sempre estão me incentivando e me apoiando em busca da minha felicidade.

Ao meu orientador, professor Dr. José Soares, pela confiança e por todo o ensinamento em relação à pesquisa e ao mundo acadêmico; sobretudo, pela orientação neste trabalho.

Às amigas e companheiras de apartamento, Acácia e Dani pela acolhida em São Paulo.

À amiga Amane, por todo apoio durante esta jornada e pelo exemplo de dedicação à pesquisa;

À amiga Sibebe, pelo apoio, incentivo e, acima de tudo, amizade quando em terras distantes.

A todos os professores pelos conhecimentos adquiridos durante todos os anos de VPS. Especialmente, aos professores Dr. Paulo Brandão, Dr. José Grisi e Dr. Sidnei Miyoshi, por elucidarem as constantes dúvidas que surgiram no decorrer do meu experimento e pela ajuda na análise dos dados.

Aos funcionários do VPS, pela assessoria, apoio, e ensinamentos, imprescindíveis na minha formação profissional. Em especial à Gisele e à Zenaide, pelos ensinamentos e pela presteza em ajudar-me sempre que necessário. E à Sheila pela ajuda constante quando da utilização do LABMAS e na elucidação de várias dúvidas.

Aos zelosos secretários: Danival, Virgínia e Cristina, pela contínua gentileza e profissionalismo.

Aos amigos e amigas pós-graduandos e estagiários: Iracema, Cássia, Leia, Mariana, Van, Cíntia Maria, Gisele, Carol... (enfim, foram muitos durante estes anos) pelo apoio, amizade e descontração, durante todos os momentos.

À bibliotecária, Elza Faquin da FMVZ/USP, pela atenção desmedida.

Ao LANAGRO pela colaboração científica e por cederem as amostras, em especial ao Dr. Pedro Mota, Marina Issa e Antônio Augusto.

A todos que me acolheram no VISAVET (Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria-Universidad Complutense de Madrid), em especial à Beatriz Romero e ao pessoal do Laboratório de Micobacterias (Fran, Alex, Johanna, Nuria, Cris, Tati e Laura), onde pude viver muitos momentos de crescimento profissional e aperfeiçoamento dos meus conhecimentos sobre o mundo das Micobactérias. E pela gentileza em ajudar-me em vários momentos deste trabalho.

Ao CNPq, à FAPESP e ao MAPA pelo incentivo financeiro.

Direi do SENHOR: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.
Salmos 91:2

RESUMO

ROCHA, V. C. F. **Avaliação do *Spoligotyping*, MIRU-VNTR e *Multispacer Sequence Typing* na discriminação de isolados autóctones de *Mycobacterium bovis***. [Evaluation by Spoligotyping, MIRU-VNTR, and Multispacer Sequence Typing in the discrimination of *Mycobacterium bovis* autochthonous isolates]. 2013. 75 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A tuberculose continua sendo uma importante doença infecciosa, tanto nos humanos quanto nos animais, com índices de morbidade e mortalidade significativos e perdas econômicas em todo o mundo. A tuberculose bovina é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium bovis*, que gera perdas na produção nos rebanhos infectados, sendo também considerada uma importante zoonose. Os métodos de diagnóstico direto têm fundamental importância para um sistema de vigilância para a tuberculose bovina e a agregação de métodos moleculares, notadamente aqueles que têm aplicação em epidemiologia, traz maior precisão diagnóstica para esses sistemas. Dentre as técnicas moleculares, destacam-se o *TB Multiplex PCR*, o *RD Multiplex PCR* e o *Multispacer Sequence Typing*, para a identificação dos isolados e o *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) e o *Spoligotyping*, como técnicas de *fingerpint* de *M. bovis*. Assim, o presente estudo teve como objetivo a identificação molecular de amostras oriundas de várias regiões do Brasil utilizando estes padrões de técnicas moleculares. Os espoligotipos identificados em maior abundância foram o SB0121, o qual apresentou-se amplamente distribuído entre as amostras, seguido pelo SB0295, SB1380, SB0140 e SB1050. Além disso, foram detectados quatro perfis nunca antes descritos na literatura, sendo que um deles foi o terceiro mais frequente entre as amostras pesquisadas. Os resultados observados neste trabalho demonstraram ainda que a tipagem pelo MIRU-VNTR revelou-se superior ao *Spoligotyping* para discriminar os isolados. Nesta perspectiva, acredita-se que as pesquisas moleculares voltadas a identificação de micobactérias, aliadas as técnicas epidemiológicas tradicionais, possam melhorar sensivelmente a performance dos sistemas de vigilância para tuberculose bovina no Brasil.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*. *Spoligotyping*. MIRU-VNTR.

ABSTRACT

ROCHA, V. C. F. **Evaluation by Spoligotyping, MIRU-VNTR, and Multispacer Sequence Typing in the discrimination of *Mycobacterium bovis* autochthonous isolates.** [Avaliação do *Spoligotyping*, MIRU-VNTR e *Multispacer Sequence Typing* na discriminação de isolados autóctones de *Mycobacterium bovis*]. 2013. 75 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Tuberculosis remains a major infectious disease in both humans and animals, with morbidity and mortality and significant economic losses. Bovine tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*, with yield losses in infected herds and is also considered an important zoonosis. The methods of direct diagnosis are important for a surveillance system for bovine tuberculosis and aggregation of molecular methods brings greater diagnostic accuracy for these systems, especially those that have application in epidemiology. Among them, *TB Multiplex PCR*, *RD Multiplex PCR*, and *Multispacer Sequence Typing* for the identification of strains, and *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) and *Spoligotyping*, for fingerprint of *M. bovis*. Thus, the present study aimed to identify molecular samples from different regions of Brazil using these molecular techniques. The most abundant were the spoligotype SB0121, which has become widely distributed among the samples, followed by SB0295, SB1380, SB0140, and SB1050. In addition, four profiles never before described in the literature were detected, one of which was the third most frequent. The results of this study also showed that the MIRU-VNTR typing has proved superior to *Spoligotyping* to discriminate the isolates. In this perspective, it is believed that the research focused on molecular identification of mycobacteria, combined traditional epidemiological techniques, can significantly improve the performance of surveillance systems for bovine tuberculosis in Brazil.

Keywords: *Mycobacterium bovis*. *Spoligotyping*. MIRU-VNTR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Gel de agarose mostrando resultados para a técnica <i>TB Multiplex PCR</i> - São Paulo - 2013	49
Figura 2 –	Gel de agarose mostrando resultados para a técnica <i>RD Multiplex PCR</i> - São Paulo - 2013	50
Figura 3 –	Resultado do <i>Spoligotyping</i> com exemplos dos espoligotipos SB0121, SB0140, SB0295 e SB0881 - São Paulo - 2013	52
Figura 4 –	Mapa temático com a distribuição geográfica do espoligotipo SB0121 no Brasil - São Paulo - 2013	52
Figura 5 –	Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 16 - São Paulo - 2013	53
Figura 6 –	Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 26 - São Paulo - 2013	53
Figura 7 –	Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 27 - São Paulo - 2013	54
Figura 8 –	Gel de agarose mostrando resultados para o ETR A - São Paulo - 2013	54
Figura 9 –	Gel de agarose mostrando resultados para o ETR B - São Paulo - 2013 .	54
Figura 10 –	Gel de agarose mostrando resultados para o ETR C - São Paulo - 2013 .	55
Figura 11 –	Dendrograma pelo método UPGMA mostrando os grupamentos das amostras de <i>M. bovis</i> segundo MIRU-VNTR, com destaque para os perfis mais frequentemente encontrados nas amostras analisadas - São Paulo - 2013	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Volumes em μL dos reagentes utilizados para a amplificação das regiões 16S rRNA do gênero <i>Mycobacterium</i> , do <i>M. intracellulare</i> , do complexo <i>M. avium</i> e o gene MPB70 específico do complexo <i>M. tuberculosis</i> - São Paulo - 2013	41
Quadro 2 –	Resultados esperados da amplificação das regiões 16S rRNA do gênero <i>Mycobacterium</i> , do <i>M. intracellulare</i> , do complexo <i>M. avium</i> e o gene MPB70 específico do complexo <i>M. tuberculosis</i> - São Paulo - 2013	42
Quadro 3 –	Volumes em μL dos reagentes utilizados para a identificação das regiões RD9 e RD12 - São Paulo - 2013	43
Quadro 4 –	Resultados esperados da amplificação das regiões RD9 e RD12 que diferenciam o <i>Mycobacterium bovis</i> dos outros membros do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - São Paulo - 2013	43
Quadro 5 –	Volumes em μL dos reagentes utilizados para a amplificação da Região DR das micobactérias, na técnica de <i>Spoligotyping</i> - São Paulo - 2013 .	45
Quadro 6 –	Volumes em μL dos reagentes utilizados para a amplificação dos loci de MIRU e ETR - São Paulo - 2013	46
Quadro 7 –	MIRUs e ETRs estudados, segundo os pesos moleculares dos loci, os primers utilizados na amplificação e a temperatura de anelamento - São Paulo - 2013	47
Quadro 8 –	Número de alelos segundo o VNTR e o peso molecular (pares de bases) do amplificado - São Paulo - 2013	47
Quadro 9 –	Novos espoligotipos com seus respectivos perfis - São Paulo - 2013	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Ocorrência de espoligotipos das 429 amostras de <i>M. bovis</i> estudadas - São Paulo - 2013	50
Tabela 2 –	Ocorrência de perfis das 434 amostras de <i>M. bovis</i> , gerados pelos VNTRs - São Paulo - 2013	56
Tabela 3 –	Comparação da discriminação das técnicas de <i>Spoligotyping</i> e VNTR, com base no número de perfis resultantes - São Paulo - 2013	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	MÉTODOS MOLECULARES	28
2.1.1	<i>TB Multiplex PCR</i>	28
2.1.2	<i>RD Multiplex PCR</i>	29
2.1.3	<i>Multispacer Sequence Typing (MST)</i>	30
2.1.4	<i>Spoligotyping</i>	31
2.1.5	<i>Variable Number Tandem Repeat (VNTR)</i>	33
3	OBJETIVOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	39
4.3	MÉTODOS MOLECULARES	40
4.3.1	<i>TB Multiplex PCR</i>	40
4.3.2	<i>RD Multiplex PCR</i>	42
4.3.3	<i>Multispacer Sequence Typing (MST)</i>	44
4.3.4	<i>Spoligotyping</i>	44
4.3.5	<i>Variable Number Tandem Repeat (VNTR)</i>	46
4.3.6	<i>Tratamento das amostras</i>	48
5	RESULTADOS	49
5.1	<i>TB MULTIPLEX PCR</i>	49
5.2	<i>RD MULTIPLEX PCR</i>	49
5.3	<i>SPOLIGOTYPING</i>	50
5.4	MIRU E ETR	53
5.5	COMPARAÇÃO DA DISCRIMINAÇÃO DAS TÉCNICAS	59
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença antiga de importância mundial nos homens e nos animais. Estima-se que o bacilo infecta 2,0 bilhões de pessoas ou aproximadamente um terço da população mundial, e que 1,5 a 2,0 milhões de pessoas morrem de tuberculose a cada ano. Da estimativa citada, 95,0% dos casos ocorrem em pessoas de países em desenvolvimento. Dentre as doenças infecciosas ao redor do globo, a tuberculose é considerada uma das principais causas de óbito (WHO, 2009).

O gênero *Mycobacterium* abrange várias espécies causadoras da tuberculose nos humanos e em outros animais. O complexo *Mycobacterium tuberculosis* inclui *M. tuberculosis*, *M. africanum* (ainda não isolado no Brasil), *M. bovis*, *M. cannetti* (não patogênico para o homem), *M. pinnipedii* (isolada em focas e leões marinhos), *M. caprae* e *M. microti* (patogênico apenas para ratazana – *Microtis agrestis*) (BIER, 1978; CORNER, 1994; BROSCH et al., 2002; COUSINS et al., 2003).

A diferenciação dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* é importante para o diagnóstico acurado da doença micobacteriana, para a vigilância na saúde pública e para o manejo adequado dos casos. Em muitos países, existem somente dados limitados em relação à incidência ou prevalência da doença causada pelas espécies específicas do complexo *M. tuberculosis* (COSIVI et al., 1998; BONARD et al., 2002). A falta de vigilância é em parte devido à falta de testes simples de rotina nos laboratórios de diagnóstico (WARREN et al., 2006).

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium bovis*. Esta doença causa perdas na produção nos rebanhos infectados e o agente infeccioso é uma importante zoonose. Embora os programas que preconizam o diagnóstico e sacrifício de animais positivos tenham reduzido substancialmente a prevalência da tuberculose bovina em muitos países desenvolvidos, nos países em desenvolvimento ainda é um problema (TORGERSON; TORGERSON, 2009). Devido a estes fatores e às vantagens no comércio oferecidas aos rebanhos livres, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foi instituído em 2001 (BRASIL, 2009).

Os métodos de diagnóstico direto têm fundamental importância para um sistema de vigilância para tuberculose bovina. Várias características biológicas das micobactérias são

utilizadas para identificar os isolados do complexo *M. tuberculosis*. Uma série de testes clássicos com base no crescimento, nas propriedades fenotípicas e bioquímicas tem sido tradicionalmente utilizada para segregar os membros do complexo *M. tuberculosis*. No entanto, juntos estes testes podem ser lentos, imprecisos, não reprodutíveis e consumirem muito tempo, além disto, podem ser ambíguos e não ser realizados por qualquer laboratório. Para complementar os testes clássicos na determinação das espécies do complexo *M. tuberculosis*, testes baseados nas características moleculares foram desenvolvidos (HUARD et al., 2003). A agregação de métodos moleculares, notadamente aqueles que têm aplicação em epidemiologia, traz maior eficiência para esses sistemas, permitindo encontrar respostas para questões relativas à transmissão entre bovinos e seus fatores de riscos, assim como o papel dos animais silvestres como reservatórios (HILTY et al., 2005).

Dentre as técnicas moleculares, destacam-se o *TB Multiplex PCR* (WILTON; COUSINS, 1992) e o *RD Multiplex PCR* (HUARD et al., 2003; HUARD et al., 2006; WARREN et al., 2006) e *Multispacer Sequence Typing* (DJELOUADJI et al., 2008) para a identificação dos isolados BAAR, e o *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) (SUPPLY et al., 1997; 2000) e *Spoligotyping* (KAMERBEEK et al., 1997), como técnicas de *fingerprint* de *M. bovis*.

Assim, o presente estudo teve por objetivo a identificação molecular de amostras oriundas de várias regiões do Brasil utilizando as técnicas moleculares *TB Multiplex PCR*, *RD Multiplex PCR* e *Multispacer Sequence Typing*. Com posterior tipagem dos isolados identificados como *M. bovis* pelas técnicas de *fingerprint* – *Spoligotyping* e *Variable Number Tandem Repeat*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O complexo *M. tuberculosis* é considerado uma família de ecotipos de Micobactérias muito semelhantes, exibindo notável homogeneidade no nível de sequência de nucleotídeos, apesar da variação na patogenicidade, na gama geográfica, em certas características fisiológicas (tais como morfologia das colônias bem como os perfis de resistência e suscetibilidade aos inibidores), epidemiologia e preferência por hospedeiros, com cada ecotipo adaptado para causar tuberculose em uma espécie ou grupo de hospedeiros específicos, embora a transmissão entre espécies possa ocorrer (EISENACH et al., 1986; FROTHINGHAM et al., 1994; SMITH et al., 2006). A divergência total na sequência do genoma dentro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* é da ordem de 0,05% (SMITH et al., 2006).

Em contraste com as hipóteses mais antigas de que a tuberculose tenha evoluído de uma doença originariamente animal para uma doença humana (DIAMOND, 2002), novos achados indicam que de fato a tuberculose primeiramente emergiu nos humanos e foi subsequentemente transmitida para os animais (WIRTH et al., 2008). Estudos recentes sugerem que o ancestral comum do complexo *M. tuberculosis* emergiu de seu ancestral de aproximadamente 40.000 anos atrás, na África Oriental. Mais tarde, após 10.000-20.000 anos, dois cladogramas evoluíram, um resultando nas linhagens humanas do *M. tuberculosis*, enquanto o outro disseminou-se dos humanos para os animais, resultando na diversificação dos seus hospedeiros e formando as outras espécies membros do complexo *M. tuberculosis*, incluindo o *M. bovis* (GUTIERREZ et al., 2005; WIRTH et al., 2008). Esta adaptação dos hospedeiros animais provavelmente coincide com a domesticação do bovino, aproximadamente há 13.000 anos (MICHEL et al., 2010).

Evidências nas formas das lesões encontradas em esqueletos, compatíveis com a doença de Pott, e especialmente o uso das técnicas baseadas no PCR identificaram a ocorrência dos casos mais antigos de tuberculose, tanto nos humanos quanto nos animais a pelo menos 3.000 a.C. (TAYLOR et al., 2005). Lesões patognomônicas de osso, indicativas de tuberculose nos bovídeos, foram encontradas em esqueletos da idade do gelo (ROTHSCHILD; MARTIN, 2006).

Na história moderna, o bovino serve como a principal espécie reservatária do *M. bovis*, assim denominando tuberculose bovina. Este termo é também normalmente usado para descrever a infecção pelo *M. bovis* em outras espécies, incluindo os animais silvestres e os

humanos, para demonstrar o bovino como fonte de infecção. A movimentação dos bovinos dentro e entre os países e continentes certamente facilitou a distribuição mundial da tuberculose bovina. Os progressos no conhecimento da distribuição populacional do *M. bovis*, advindos dos métodos de tipagem baseados em sua estrutura genética, vem permitindo a identificação de complexos clonais dominantes em áreas geográficas mais abrangentes (MICHEL et al., 2010).

Os dados históricos sugerem que a tuberculose bovina surgiu na Europa e foi distribuída pelo mundo, principalmente durante o período colonial. Myers e Steele (1969) sugeriram que o *M. bovis* surgiu na Europa e se disseminou para o norte da Itália e de lá para a Europa ocidental e Reino Unido. De acordo com Webb (1936), o *M. bovis* foi distribuído para o mundo pela exportação de bovinos infectados do Reino Unido (principalmente) e dos Países Baixos para suas respectivas colônias (RENEWICK et al., 2007).

A intensificação da indústria leiteira em combinação com a movimentação da espécie bovina tem contribuído na transmissão do *M. bovis*, especialmente na ausência de medidas apropriadas de controle (GILBERT et al., 2005). O comércio de gado entre países vizinhos e sócios leva à uma dispersão do *M. bovis* e à dominância de complexos clonais em amplas áreas (MÜLLER et al., 2008). Estudo recente da filogeografia dos complexos clonais do *M. bovis*, que estuda a localização geográfica dos seus tipos moleculares, verificou a existência de quatro grandes complexos clonais de *M. bovis*, *African 1*, *African 2*, *European 1* e *European 2* (MÜLLER et al., 2009; BERG et al., 2011; SMITH et al., 2011; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012). O complexo clonal *European 1* está mundialmente distribuído e já foi identificado nas Ilhas Britânicas, nas ex-colônias britânicas, nas Américas, bem como no Cazaquistão e na Coreia, sugerindo que as raças bovinas recentes, como a Hereford, criada no Reino Unido no século 18, pode ter sido um bom veículo para a distribuição mundial desse grupo estreitamente conexo de estirpes e que a distribuição mundial do patógeno bovino resultou do comércio humano de animais nos últimos 200 anos (SMITH, 2012), corroborando com as hipóteses de Webb de 1936.

Os complexos clonais são grupos de estirpes, onde todas são descendentes de uma única célula que foi o mais recente ancestral comum (MRCA) e todas dividem características derivadas deste MRCA. Ou seja, o MRCA de qualquer grupo de estirpe de *M. bovis* é uma única célula que existiu em um lugar e em um tempo (e desde então tem sido distribuído ao redor do mundo) e a constituição genética do MRCA pode ser reconstruída, com parcimônia, do conteúdo genético das amostras sobreviventes (SMITH, 2012). A constituição populacional do *M. bovis* é estruturada de forma irregular e consiste de uma série de grandes e

pequenos complexos clonais. Esta estrutura populacional não é única para o *M. bovis*, o grupo Beijing de *M. tuberculosis* pode ser descrito como um complexo clonal tal como pode ser a *Salmonella typhi* (um complexo clonal da *Salmonella enterica* subsp. entérica) ou *Shigella sonnei* (um complexo clonal da *Escherichia coli*). Alguns autores consideram que todas as espécies tradicionais descritas na microbiologia poderiam ser consideradas como complexos clonais. E há um número de razões pelas quais alguns clones alcançaram alta frequência na população, uma delas é a seleção, ou seja, a dominância de clones individuais em uma determinada região pode ser o resultado de um efeito iniciador recente – um clone introduzido em um novo território emergindo na ausência de competidores (SMITH et al., 2003).

Um complexo clonal de estirpes de *M. bovis* pode ser identificado por um marcador molecular estável que está presente, e que seja único, na célula que foi o MRCA do complexo clonal. Todos os membros do complexo clonal irão transportar o marcador molecular através da descendência e o marcador molecular define quais são os membros deste complexo. Os marcadores moleculares mais úteis identificam as deleções cromossômicas únicas (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012). Deleções cromossômicas são preferidas porque são marcadores estáveis e, provavelmente de forma independente, aparece em diferentes linhagens. O uso das deleções como marcadores dos complexos clonais tem a vantagem de que o ensaio pode ser realizado por PCR, usando primers definidos e eletroforese em gel de agarose para examinar os tamanhos dos produtos do PCR, além de barato é de fácil manuseio. O mais importante, a tecnologia para ensaiar estas deleções é acessível a muitos laboratórios ao redor do mundo e facilita o exame rápido de grandes números de estirpes na vigilância de populações. Uma utilização significativa dos complexos clonais é formular hipóteses que podem ser testadas para entender a patogenicidade e difusão deste importante patógeno (SMITH, 2012).

Uma das maiores questões da epidemiologia do *M. bovis* no cenário da erradicação da tuberculose bovina é a definição da(s) fonte(s) de infecção e da(s) rota(s) de transmissão para os humanos. Como um resultado dos avanços tecnológicos, o conhecimento acerca da variabilidade genética dentro do complexo *M. tuberculosis* está aumentando e os critérios genéticos são rotineiramente utilizados para identificar os isolados pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (BARNES; CAVE, 2003). Protocolos comumente empregados, tais como análise da região de inserção *IS6110* pelo *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e mesmo a tipagem pelos oligonucleídeos espaçadores (*Spoligotyping*), tem fornecido os meios para a diferenciação confiável entre as estirpes do complexo *M. tuberculosis*, visando as regiões cromossômicas polimórficas que estão normalmente associadas com as sequências

de inserções móveis e/ou outros elementos repetitivos (BARNES; CAVE, 2003). A comparação de perfis moleculares de amostras tem se tornado uma valiosa ferramenta no estudo da epidemiologia do *M. bovis*, produzindo dados que melhoram a performance de sistemas de vigilância e é um componente essencial das investigações epidemiológicas nos programas de controle da tuberculose, esclarecendo as relações entre espécies, além disso, possibilitando o entendimento das relações filogenéticas entre os diferentes complexos clonais grassantes no mundo (LARI et al., 2010).

Portanto, os métodos moleculares de identificação e discriminação de *M. bovis* significam informação epidemiológica de qualidade que aumentam a eficiência dos programas de controle/erradicação da tuberculose bovina, possibilitando a formulação de hipóteses para explicar a patogenicidade e a difusão deste importante agente infeccioso (HILTY et al., 2005).

2.1 MÉTODOS MOLECULARES

2.1.1 TB Multiplex PCR

Uma comparação da sequência de DNA da região 16S do rRNA revelou que esta é uma região em que existe uma pequena variação entre as espécies de micobactérias. Esta informação foi utilizada para desenvolver um sistema de amplificação em multiplex que identifica o gênero *Mycobacterium* e diferencia as espécies *M. avium* e *M. intracellulare* do complexo *M. tuberculosis*. A região gênero específica inclui a sequência onde ocorre a menor variação entre as espécies de micobactérias. Os oligonucleotídeos MYCGEN-F e MYCGEN-R são específicos para o gênero *Mycobacterium* e não causam reação cruzada com nenhum outro gênero (WILTON; COUSINS, 1992).

A combinação dos primers referentes ao rRNA juntamente com os primers que visam o gene MPB70, correspondente à proteína secretora MPB70 presente nos organismos do complexo *M. tuberculosis*, permite a detecção e identificação de micobactérias clinicamente significantes em um único tubo. Assim, o TB Multiplex PCR tem como alvos as sequências do gene 16S rRNA (G-1 e G-2) específico do gênero *Mycobacterium*; as sequências das regiões hipervariantes de 16S rRNA específicas do *Mycobacterium intracellulare* (MYCINT-

F) e do complexo *Mycobacterium avium* (MYCAV-R); e o gene MPB70 específico do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (TB-1A e TB-1B). Um produto de amplificação de 1030bp é indicativo do gênero *Mycobacterium* e fragmentos menores de 850, 372 e 180bp são sinais positivos para *M. intracellulare*, complexo *M. tuberculosis* e *M. avium*, respectivamente (WILTON; COUSINS, 1992).

2.1.2 RD Multiplex PCR

Os dados atuais indicam que os organismos do complexo *M. tuberculosis* e suas sublinhagens alcançaram uma diversidade genética e biológica através da discreta combinação adquirida dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (*Single-Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) ou como polimorfismos de sequências longas (*Long Sequence Polymorphisms* - LSPs), bem como por meio de alterações nos genes tais como as deleções, inserções, inversões e duplicações (conhecidas como loci de regiões de diferenças RD) (BROSCH et al., 2002; COLE, 2002). Ou seja, os loci de RD representam mudanças irreversíveis na composição genética, que resultam provavelmente de erros na replicação do DNA, ou do movimento dos elementos genéticos móveis, ou da transdução mediada pelo micobacteriófago, ou da recombinação entre fragmentos de DNA homólogos adjacentes com a perda da sequência intermediária (COLE, 2002).

Os SNPs dentro das espécies do complexo *M. tuberculosis* já foram muito bem identificadas como responsáveis pela resistência a medicamentos. Por outro lado, estudos genômicos comparativos empregando diversas estratégias genéticas de hibridização revelaram regiões de diferenças (RD) representando a perda de material genético no *M. bovis* BCG quando em comparação com a cepa H37Rv do *M. tuberculosis* (BEHR et al., 1999; BROSCH et al., 1998; GORDON et al., 1999). Acredita-se que uma destas deleções tenha sido o evento de atenuação primária na derivação do *M. bovis* BCG do *M. bovis*, já que todos os isolados de *M. bovis* BCG possuem esta deleção (BEHR et al., 1999).

Alguns loci de RD estão restritos às espécies ou estirpes pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, enquanto outros demonstraram estar distribuídos entre agrupamentos do complexo (GORDON et al., 1999; BROSCH et al., 2002). Este dado sugeriu uma acumulação dos LSPs e dos SNPs e foi usado para construir um mapa filogenético da evolução do complexo *M. tuberculosis* (BROSCH et al., 2002). Conclui-se que os dados referentes aos loci

RD sustentam a teoria de que a acumulação dos LSPs e dos SNPs é uma estratégia adaptativa significativa para as espécies do complexo *M. tuberculosis* que serviu para gerar uma diversidade genética e biológica (BROSCH et al., 2002).

Uma vez estabelecida uma linhagem clonal, acredita-se que os LSPs e os SNPs nos organismos do complexo *M. tuberculosis* sejam relativamente estáveis ao longo do tempo e frequentemente os LSPs e os SNPs identificados em certos genes tem sido usados, sozinhos ou em combinação, tanto como marcadores específicos para uma determinada espécie do complexo *M. tuberculosis* ou para caracterizar isolados dentro da filogenia do complexo (BROSCH et al., 2002; ; MOSTOWY et al., 2002; HUARD et al., 2003).

2.1.3 *Multispacer Sequence Typing* (MST)

A discriminação de estirpes de microrganismos pela técnica de *Multispacer Sequence Typing* (MST) é feita pela detecção de polimorfismos em várias regiões do genoma, especialmente as regiões espaçadoras intergênicas (DRANCOURT et al., 2004). Baseia-se no sequenciamento destas regiões intergênicas, que são selecionadas após a análise completa do genoma. Esta análise permite reconhecer toda a diversidade genética dos marcadores utilizados pela comparação de resultados *in silico*, associada à utilização de ferramentas de bioinformática. Possibilitando, assim, a discriminação de isolados a partir de diferentes eventos genéticos observados em uma única sequência e permitindo diferenciar geneticamente isolados relacionados com base no sequenciamento das regiões espaçadoras, utilizando regiões menos estáveis do genoma, que associadas, permitem observar padrões de descendência evolutiva a partir da análise de agrupamentos de isolados que conciliam características genéticas comuns. Os métodos de tipagem realizados com base no sequenciamento fornecem dados importantes sobre forças evolutivas que moldam as populações bacterianas (COMAS et al., 2009). Tem sido aplicados para vários patógenos, incluindo *Yersinia pestis*, *Bartonella quintana*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia prowazekii*, *Coxiella burnetii* e *Bartonella henselae*.

Em relação às micobactérias, a técnica tem demonstrado ser uma boa alternativa para a genotipagem de amostras com poucas cópias de IS6110, como é o caso do *M. bovis*. Djelouadji et al. (2008) identificaram, através do sequenciamento, 14 regiões intergênicas variáveis no genoma do *M. tuberculosis* após a análise da amostra de referência H37Rv.

Posteriormente, houve a identificação destes espaçadores nas amostras em estudo, seguido do alinhamento filogenético, agrupando estas amostras em diferentes alelos espaçadores ou tipos de espaçadores. Em um estudo desenvolvido por Sales (2012) no Brasil, sete regiões espaçadoras foram analisadas para isolados de *M. bovis*, identificando a presença de quatro tipos de eventos genéticos: mutação de nucleotídeo único (SNP), inserção, deleção e repetição em tandem. O autor relatou ao final do experimento que o método se mostrou eficiente para detectar a variabilidade genética presente nas sequências analisadas e para inferir relações evolutivas em curto prazo, o que pode contribuir com estudos epidemiológicos acerca do bacilo bovino.

2.1.4 Spoligotyping

A tipagem pelo *Spoligotyping* baseia-se na amplificação por PCR do DNA presente no locus, denominado de região de repetição direta (*Direct Repeat – DR*), presente exclusivamente no genoma de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (KAMERBEEK et al., 1997).

O *Spoligotyping* foi introduzido como um método rápido para determinar a epidemiologia molecular da tuberculose humana, e como uma alternativa para a identificação de amostras com poucas cópias de *IS6110* (KAMERBEEK et al., 1997).

O elemento DR foi identificado por Hermans et al. em 1991, quando caracterizaram a inserção do elemento *IS986* de *M. bovis*-BCG e o DNA cromossomal paralelo a este elemento. Cada região DR corresponde à repetição regular de 2 tipos de pequenas sequências: que são todas idênticas, chamadas de sequências DR e sequências que são todas diferentes, chamadas de espaçadores. Entre as sequências DRs estão localizadas as sequências espaçadoras não repetitivas que podem conter de 34 a 41 pb (HERMANS et al., 1991). A associação de um espaçador e uma sequência contínua de DR é chamada de DVR. Comparando-se as regiões DR de vários isolamentos, observou que a ordem dos espaçadores era aproximadamente a mesma em todos os isolados, as diferenças encontravam-se na ocorrência de deleções e inserções dos espaçadores. Assim, o polimorfismo de vários isolamentos é comprovado pela ausência ou presença de um ou mais espaçadores (ARANAZ et al., 1996). E também está relacionado ao número de regiões DR em diferentes isolados (HADDAD et al., 2004). O número de DRs varia entre as diferentes espécies de

micobactérias do complexo *M. tuberculosis* e está presente em um número de 49 cópias em *M. bovis*-BCG e 39 em *M. tuberculosis* H37Rv.

As bases moleculares deste polimorfismo estão provavelmente relacionadas à recombinação homóloga entre as DRs próximas ou distantes e também em função do rearranjo ocorrido devido a presença do transposon, que são regiões de DNA que podem se transferir de uma região para outra do genoma, deixando ou não uma cópia no local antigo onde estavam (IS é um exemplo) (ARANAZ et al., 1996).

A técnica de *Spoligotyping* (para “*spacer oligotyping*”) que é uma “técnica de hibridização da linha reversa em blot” (HADDAD et al., 2004) envolve duas etapas. A primeira etapa consiste na amplificação, por PCR, dos espaçadores presentes entre as regiões DR. Uma das vantagens desta técnica é que somente um par de primers, *a* e *b*, específicos às duas extremidades das sequências DR, são necessários para amplificar todos os espaçadores presentes. O primer *a* está ligado a uma enzima, a fim de permitir a detecção dos produtos amplificados. O objetivo da segunda etapa é revelar quais espaçadores foram amplificados nos isolados em estudo. Esta etapa envolve a hibridização dos espaçadores a uma membrana, usando um minibloter. Nesta membrana, oligonucleotídeos correspondentes aos diferentes espaçadores estão covalentemente ligados/imobilizados. Os produtos amplificados são depositados nos ângulos certos das linhas dos oligoespaçadores e a presença de um espaçador é revelada por um ponto de inserção dos oligonucleotídeos e as linhas de amplificação, usando um método químico (ARANAZ et al., 1996; COUSINS et al., 1998; ZUMÁRRAGA, 1999; HADDAD et al., 2004).

No *Spoligotyping* convencional, usando o minibloter, até 45 isolados podem ser comparados ao mesmo tempo (KAMERBEEK et al., 1997). Além disto, na técnica clássica, 43 diferentes oligoespaçadores estão ligados à membrana e teoricamente, 43 diferentes caracteres estão disponíveis para qualquer isolado, ou seja, é capaz de detectar a presença ou ausência de 43 espaçadores (HADDAD et al., 2004). Mas, para cada subespécie, alguns espaçadores estão sempre ausentes, permitindo a sua diferenciação (KAMERBEEK et al., 1997). No caso do *M. bovis*, os espaçadores 3, 9, 16 e 39-43 estão sempre ausentes (KAMERBEEK et al., 1997; NIEMANN et al., 2000). Já o *Spoligotyping* de segunda geração detecta a presença dos 43 espaçadores tradicionais utilizando oligonucleotídeos otimizados, além de 25 novas sequências de espaçadores, com o objetivo de aumentar o poder de discriminação de isolados de *M. bovis* (VAN DER ZANDEN et al., 2002).

Uma das vantagens da técnica é a rapidez, o custo baixo e a tipagem das estirpes de *M. bovis*, assim como de *M. tuberculosis*. Além de ser capaz de distinguir especificidades

geográficas entre seus espoligotipos, de modo que alguns isolados agrupados em famílias estejam relacionados a uma determinada população, região geográfica e até a própria história da dispersão da tuberculose no mundo (SOLA et al., 1999). Entretanto, alguns estudos demonstraram que apenas o *Spoligotyping* não seria suficiente para todas as correlações epidemiológicas entre as cepas de *M. bovis*, especialmente, porque todo o polimorfismo genético está restrito a um único locus, ao agrupamento DR, havendo a necessidade de associações com outros métodos moleculares, já que a técnica de *Spoligotyping* possui menor discriminação que as técnicas citadas acima (ARANAZ et al., 1996; KAMERBEEK et al., 1997; COUSINS et al., 1998; ZUMÁRAGA, 1999; FILLIOL et al., 2000; RORING et al., 2002).

O *Spoligotyping* pode ser usado como técnica de triagem para identificar os membros do complexo clonal (KAMERBEEK et al., 1997), onde os membros de cada complexo clonal tem uma assinatura distinta de *Spoligotyping* e são identificados por uma única deleção presente em cada membro do complexo clonal (SMITH, 2012).

Segundo Rodriguez et al., em um estudo realizado no Estado de São Paulo em 2004, concluiu-se que a discriminação molecular de isolados de *M. bovis* através do *Spoligotyping* constitui-se numa ferramenta valorosa para dar apoio e racionalidade aos sistemas de vigilância para detecção de focos de tuberculose bovina, sistema este de grande importância para as áreas de baixa prevalência de focos, como parece ser grande parte do território brasileiro.

2.1.5 Variable Number Tandem Repeat (VNTR)

Sequências repetidas em tandem estão dispersas em inúmeras cópias nos genomas dos eucariotos (COX; MIRKIN, 1997). Os loci com pequenas sequências repetidas (SSR) de 1-13bp são normalmente citadas como microsátélites, e aqueles com sequências repetidas de 10-100bp como minisátélites (TAUTZ; RENZ, 1984; TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994). Muitos destes loci possuem hipervariabilidade em seus números de repetições nos humanos e nos animais e são também denominados de loci de VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) (NAKAMURA et al., 1987, 1988). Os VNTR são encontrados nas regiões intergênicas e não intergênicas do genoma, interferindo nos processos de regulação da célula; também possuem funções nas trocas moleculares nos microrganismos, na regulação da transcrição e

possivelmente na tradução (VAN BELKUM, 1999). Nos mamíferos, as instabilidades anormais nos micro e minisatélites podem estar associadas com doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, epilepsia e cânceres (BUARD; JEFFREYS, 1997).

Os loci genéticos contendo VNTR formam a base do mapeamento genético humano e são usados na medicina forense humana e nos testes de paternidade (NAKAMURA et al., 1987, 1988). Também são ferramentas de grande valor nos estudos de vários aspectos evolutivos, assim como para os estudos de genética populacional nos eucariotos (JEFFREYS et al., 1994; EPPLIN et al., 1997).

O polimorfismo nos loci do tipo repetição em tandem pode ocorrer tanto como uma mudança na sequência dos nucleotídeos, como da variação no número de unidades repetidas, consequentemente ambas criando uma variação alélica. A tipagem pelo VNTR é baseada no polimorfismo dos números destas sequências repetitivas organizadas em tandem no DNA (VAN BELKUM et al., 1998).

As bactérias podem ser utilizadas como modelos para simulação dos aspectos evolutivos e dos mecanismos de variabilidade das repetições em tandem presentes no genoma, especialmente para patógenos geneticamente homogêneos tais como *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* (LE FLECHE et al., 2001) e os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (SUPPLY et al., 1997). Muitos microsátélites com SSR (pequenas sequências repetidas) foram caracterizados em vários genomas dos procariotos, muitos deles apresentam alto polimorfismo (VAN BELKUM et al., 1997). Os métodos baseiam-se na amplificação por PCR usando primers específicos para as regiões flangeadoras dos VNTR e na determinação dos tamanhos dos amplicons, que refletem os números de cópias das VNTR amplificadas. O uso destes métodos fornece dados em um formato numérico portátil simples, adequado para o estudo da epidemiologia molecular dos agentes infecciosos (FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998).

Em 1997, Supply et al. identificaram 29 loci de VNTR presentes no genoma dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que denominaram de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unitis* (MIRU), sendo estes similares às sequências de minissatélites descritas no genoma humano. Em 2000, Supply et al. pesquisando o genoma da cepa H37Rv do *M. tuberculosis* através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), identificaram 12 novos loci em adição aos 29 identificados anteriormente (SUPPLY et al., 1997). Esses MIRU são importantes marcadores para os estudos de evolução e de relações filogenéticas. Estão dispersos em regiões intergênicas do genoma do complexo *M. tuberculosis* e possuem

de 40 a 100 pb, tendo sido descritos como úteis na genotipagem dos seus isolados (SUPPLY et al., 1997).

Os MIRU são classificados em três classes (I, II e III) com base no seu comprimento, sequência nucleotídica e organização. As sequências do tipo I contêm aproximadamente 77pb enquanto as sequências dos tipos II e III são caracterizadas por um intervalo (*gap*) de 24 e 15pb nas extremidades 3' e 5' das sequências do tipo I, respectivamente. Sequências mistas dos tipos III/II, contendo *gaps* de ambos os tipos (SUPPLY et al., 1997).

Muitos os MIRU contem um *open reading frame* (ORF), que é uma porção do genoma que contem uma sequência de bases que pode codificar uma proteína. Estes ORF possuem os códons de terminação e de iniciação dos seus flaqueadores genéticos (SUPPLY et al., 1997). Estes flaqueadores estão envolvidos em diversos mecanismos metabólicos e regulatórios, incluindo a biossíntese ou degradação dos lipídeos, dos ácidos nucleicos e das proteínas, produção de energia ou transdução de sinais. Nenhuma relação óbvia pode ser encontrada entre a função destes genes e o polimorfismo ou monomorfismo dos flaqueadores dos MIRU (SUPPLY et al., 2000).

A tipagem pelo MIRU-VNTR detecta, através da verificação do tamanho dos produtos amplificados, o número de repetições dos loci. Os produtos amplificados são separados por eletroforese em géis de agarose e o tamanho dos fragmentos amplificados é verificado, e calculado o número de alelos (BARNES; CAVE, 2003).

Em comparação com a técnica de RFLP-IS6110, a tipagem pelo MIRU-VNTR tem apresentado consideráveis avanços por ser rápida, reprodutível, sensível, apropriada para todos os isolados do complexo *M. tuberculosis*, incluindo amostras que têm poucas cópias de IS6110 e também permite rápidas e fáceis comparações de resultados entre laboratórios (MAZARS et al., 2001). Por ser baseado na amplificação pelo PCR, pode ser executada em colônias de micobactérias sem necessidade de extensivas purificações de DNA. Após a amplificação pelo PCR, para a identificação dos fragmentos amplificados, no gel de eletroforese há a necessidade somente de marcadores de peso molecular com uma resolução de aproximadamente 50bp. Com estas vantagens, a tipagem pelo MIRU-VNTR pode ser amplamente acessível para pesquisas em laboratórios de saúde pública (MAZARS et al., 2001; BARNES; CAVE, 2003).

Em um estudo realizado por Supply et al., em 2001, utilizando um PCR-multiplex e um analisador de DNA fluorescente com um sistema de automação computadorizada para a genotipagem das espécies, demonstraram que o teste é 100% reprodutível, sensível e específico para isolados do complexo *M. tuberculosis*, performance não alcançada por

nenhum outro método testado nas mesmas condições. E propuseram a criação de um banco de dados vinculado pela Internet.

Em 1994, Goyal et al. desenvolveram um método, também baseado no PCR, para identificação e diferenciação de amostras do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, amplificando um fragmento polimórfico correspondente a região *katG*. Zhang e Young (1994) haviam identificado variações nesta região no cromossomo de amostras do *M. tuberculosis* e também do *M. bovis*. Este locus foi identificado como uma repetição exata em tandem (ETR), localizada em grandes ORF e foi denominado de ETR-A.

Em 1998, Frothingham e Meeker-O'Connell identificaram mais 05 (cinco) loci de ETR (ETR B-F) e cada locus continha grandes repetições em tandem. Estes pesquisadores também demonstraram que os ETR-D e E são idênticos aos MIRU 4 e 31 e estão localizados em espaçadores intergênicos. Estes loci de ETR contêm repetições em tandem de seqüências de DNA idênticas. E cada locus tem uma única seqüência de repetição, variando em tamanho de 53 a 79bp (FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998).

Estas regiões do genoma dos membros do complexo *M. tuberculosis* têm sido estudadas e aplicadas com sucesso nos estudos globais sobre a suas diversidades genéticas e em estudos de vigilância epidemiológica da tuberculose (KANDUMA et al., 2003), com grande potencial de substituir a tipagem pelo RFLP-IS6110, sobretudo com aumento do seu poder discriminatório.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos :

- identificação molecular de amostras oriundas de várias regiões do Brasil utilizando as técnicas moleculares *TB PCR Multiplex*, *RD Multiplex PCR* e *Multispacer Sequence Typing*
- tipagem dos isolados identificados como *M. bovis* pelas técnicas de *Spoligotyping* e *Variable Number Tandem Repeat*

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada para a realização deste estudo é descrita nos tópicos abaixo.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi examinada uma coleção de isolados de *Mycobacterium bovis* provenientes de todo o Brasil, concedida pelo LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais), que foram identificadas previamente pelo referido Laboratório pela técnica *Multispacer Sequence Typing*.

Nos ensaios realizados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo, com as amostras enviadas pelo LANAGRO, se a amostra era identificada como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* pela técnica de *TB Multiplex PCR*, esta era discriminada pelo *RD Multiplex PCR* diferenciando o *M. bovis* dos outros membros do complexo *M. tuberculosis*. Posteriormente, estas amostras foram tipificadas pelos métodos de *Spoligotyping* e *Variable Number Tandem Repeat*.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O método CTAB foi o utilizado para o isolamento e purificação do DNA das micobactérias, com algumas adaptações (KREMER et al., 1999).

Aproximadamente 50mg de massa bacteriana foram transferidas, com o auxílio de alças descartáveis, para um tubo de microcentrífuga de 1500µL e misturado com 400 µl de tampão TE (10mM Tris-HCl + 1 mM EDTA pH 8,0). A suspensão era incubada a 80°C por 30 minutos para a inativação dos bacilos (BREMER-MELHIOR; DRUGEON, 1999). Em seguida, adicionava-se 50µL de lisozima na concentração de 10 mg/ml; a mistura era agitada e incubada a 37°C por uma hora ou preferivelmente overnight.

Acrescentou-se 75µL de uma solução de proteinase K/SDS [5µL de proteinase K (10mg/mL) e 70µL de SDS (10%)], agitava-se e incubava a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de NaCl a 5M e, em seguida, 100µL da solução CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10g de CTAB em 100mL de H₂O), pré-aquecido a 65°C. A mistura era agitada até que o líquido se tornasse branco e incubada novamente por 10 minutos a 65°C.

Acrescentou-se 750µL de clorofórmio: álcool isoamílico (na proporção de 24:1), agitando-se por 10 segundos e, em seguida, centrifugando a 12000g por 7 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) era transferido para um novo tubo de microcentrífuga, o DNA era precipitado com 450µl de isopropanol (2-propanol) e resfriado a -20°C, por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000g, por 15 minutos e após desprezar a maior parte do sobrenadante os sedimentos eram lavados, centrifugando-os com 1000µL de etanol frio a 70% a 12000g, por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento seco foi redissolvido em TE e estocado a -20°C até o uso.

4.3 MÉTODOS MOLECULARES

4.3.1 TB Multiplex PCR

O TB Multiplex PCR identifica as espécies de *Mycobacterium* e diferencia o complexo *M. tuberculosis* do complexo *M. avium*, *M. intracellulare* e outras *Mycobacterium* spp. Constitui-se em um método *in vitro* de análise de ácidos nucleicos, pela qual um segmento particular do DNA pode ser especificamente replicado, mais precisamente as sequências do gene 16S rRNA (G-1 e G-2) específico do gênero *Mycobacterium*, as sequências com a região hipervariante de 16S rRNA que são conhecidamente específicas do *M. intracellulare* e o complexo *M. avium* e o gene MPB70 específico do complexo *M. tuberculosis*.

Foram realizadas reações de 50µL, contendo tampão de reação, dNTP (1,25mM cada), 20pmol de cada oligonucleotídeo, 50mM de KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5mM de MgCl₂, 10 pmol/µL dos iniciadores, 1,25 unidades de TAQ polymerase (1,0µL) e 5µL do DNA em estudo. Os primers utilizados foram: MYCGEN-F (G1) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e MYCGEN-R (G2) (5'-

TGCACACAGGCCACAAGGGA-3') – referentes ao gênero; TB-1F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') e TB-1R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') – referentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*; MYCAV-R (5'-ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3') – referente ao *Mycobacterium avium*; e MYCINT-F (5'CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3') – referente ao *Mycobacterium intracellulare* (Quadro 1). Foram utilizadas como controles positivos: a cepa AN5 de *M. bovis* para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, a cepa ATCC 582 para o complexo *Mycobacterium avium* e a cepa ATCC 13950 para o *Mycobacterium intracellulare*.

Quadro 1 – Volumes em μL dos reagentes utilizados para a amplificação das regiões 16S rRNA do gênero *Mycobacterium*, do *M. intracellulare*, do complexo *M. avium* e o gene MPB70 específico do complexo *M. tuberculosis* - São Paulo - 2013

Reagente	Volume/amostra (μL)
Água ultra pura	28,1 μl
DNTPs 1,25Mm	8,0 μl
Buffer	5,0 μl
MgCl ₂ 50mM	1,5 μl
PRIMER 1 (MYCGEN-F) 10 pmol/ μL	0,6 μl
PRIMER 2 (MYCGEN-R) 10 pmol/ μL	0,6 μl
PRIMER 3 (MYCAV-R) 10 pmol/ μL	0,6 μl
PRIMER 4 (MYCINT-F) 10 pmol/ μL	0,6 μl
PRIMER 5 (TB1-F) 10 pmol/Ml	0,6 μl
PRIMER 6 (TB1-R) 10 pmol/ μL	0,6 μl
Taq DNA-Polimerase (1,25U)	0,3 μl
MIX	45,0 μl
DNA extraído	5,0 μl
TOTAL	50,0μl

Os ciclos do PCR empregados foram:

Ciclo 1 (1 vez)

- desnaturação - 94°C por 10 minutos;
- anelamento - 61°C por 2 minutos;
- extensão - 72°C por 3 minutos.

Ciclo 2 (33 vezes)

- desnaturação - 94°C por 30 segundos;
- anelamento - 61°C por 2 minutos;
- extensão - 72°C por 3 minutos.

Ciclo 3 (1 vez)

- desnaturação - 94°C por 30 segundos;
- anelamento - 61°C por 2 minutos;

- extensão - 72°C por 10 minutos.

Obtendo-se como resultados o indicado no quadro 2:

Quadro 2 – Resultados esperados da amplificação das regiões 16S rRNA do gênero *Mycobacterium*, do *M. intracellulare*, do complexo *M. avium* e o gene MPB70 específico do complexo *M. tuberculosis* - São Paulo - 2013

Tamanho do produto amplificado (bp)	Identificação
Somente 1030	DNA consistente com espécies do gênero <i>Mycobacterium</i>
1030 e 850*	DNA consistente com <i>M. intracellulare</i>
1030 e 372*	DNA consistente com complexo <i>M. tuberculosis</i>
1030 e 180*	DNA consistente com complexo <i>M. avium</i>
Nenhum produto amplificado	Negativo

*Se a banda do gênero não é detectada, mas a banda das espécies é detectada, os resultados são como descritos.

A revelação do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose de 1,5% a 2% (p/v), usando-se tampão de corrida TBE (0,04M Tris-acetato e 0,001M EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados na solução de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain em substituição ao brometo de etídio. A visualização e a documentação foram feitas pelo sistema de fotodocumentação automático AlphaImager®.

4.3.2 RD Multiplex PCR

O *RD Multiplex PCR* diferencia os membros do complexo *M. tuberculosis*. Este método foi aplicado para todas as amostras que demonstrarem conter DNA consistente com o complexo *M. tuberculosis* pelo *TB Multiplex PCR*.

Foram realizadas reações de 25µL, contendo tampão de reação, dNTP (1,25mM cada), 20pmol de cada oligonucleotídeo, 50mM de KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5mM de MgCl₂, iniciadores RD9-1(5'-CAAGTTGCCGTTTCGAGCC-3'), RD9-2 (5'-CAATGTTTGTTCGCTGC-3'), RD9-3 (5'-GCTACCCTCGACCAAGTGTT-3'), RD12-1 (5'-GGGAGCCCAGCATTACCTC-3'), RD12-2(5'-GTGTTGCGGGAATTACTCGG-3'), RD12-3(5'-AGCAGGAGCGGTTGGATATTC-3'), 1,25 unidades de TAQ polymerase (1,0µL) e 5µL do DNA em estudo (Quadro 3) e foram utilizadas como controles positivos: a cepa AN5 para o *M. bovis* e a cepa H37Rv para o *M. tuberculosis*.

Quadro 3 – Volumes em μL dos reagentes utilizados para a identificação das regiões RD9 e RD12 - São Paulo - 2013

Reagente	Volume/amostra (μL)
Água ultra pura	11,375 μl
Pool DNTPs 1,25mM	4,0 μl
Buffer	2,5 μl
MgCl ₂ 50mM	2,0 μl
PRIMER RD9-1 10 pmol/ μL	0,5 μl
PRIMER RD9-2 10 pmol/ μL	0,5 μl
PRIMER RD9-3 10 pmol/ μL	0,5 μl
PRIMER RD12-1 10 pmol/ μL	0,5 μl
PRIMER RD12-2 10 pmol/ μL	0,5 μl
PRIMER RD12-3 10 pmol/ μL	0,5 μl
Taq DNA-Polimerase (1,25U)	0,125 μl
MIX	23,0 μl
DNA extraído	2,0 μl
TOTAL	25,0μl

O ciclo do PCR empregado foi:

- desnaturação inicial - 95°C por 15 minutos;
- desnaturação do DNA - 94°C por 1 minuto, 45 vezes do ciclo de amplificação;
- anelamento - 62°C por 1 minuto, 45 vezes do ciclo de amplificação;
- extensão - 72°C por 1 minuto, mais 45 vezes do ciclo de amplificação.
- extensão final - 72°C, por 10 minutos.

Como resultados para cada membro do complexo *M. tuberculosis*, podia-se observar, de acordo com o quadro 4:

Quadro 4 – Resultados esperados da amplificação das regiões RD9 e RD12 que diferenciam o *Mycobacterium bovis* dos outros membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* - São Paulo - 2013

	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i>	<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	<i>M.</i> <i>africanum</i> subtipo II	<i>M. africanum</i> subtipo I	Bacilo Dassie	<i>M.</i> <i>pinnipeddi</i>	<i>M. microti</i>
RD9	108bp	108bp	235bp	235bp	108bp	108bp	108bp	108bp
RD12	306bp	306bp	369bp	369bp	369bp	369bp	369bp	369bp

A revelação do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose de 1,5% a 2% (p/v), usando-se tampão de corrida TBE (0,04M Tris-acetato e 0,001M EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados na solução de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain em substituição ao brometo de etídio. A visualização e a documentação foram feitas pelo sistema de fotodocumentação automático AlphaImager®.

4.3.3 *Multispacer Sequence Typing (MST)*

Em colaboração com o LANAGRO (Pedro Leopoldo-MG), foram identificadas as regiões intergênicas no genoma das amostras de referência do *M. bovis*, buscando-se identificar os diferentes alelos espaçadores ou tipos de espaçadores, com posterior aplicação nas amostras de campo e análise da formação dos agrupamentos filogenéticos. A técnica foi testada nas amostras que foram enviadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, para confirmação dos resultados.

4.3.4 *Spoligotyping*

Esta técnica baseia-se em duas etapas, a primeira etapa consiste na amplificação, por PCR, dos espaçadores presentes entre as regiões DR, nos membros do complexo *M. tuberculosis*. A segunda etapa envolve a hibridização dos espaçadores a uma membrana, usando um minibloter. Nesta membrana, oligonucleotídeos correspondentes aos diferentes espaçadores estão covalentemente ligados/imobilizados. Os produtos amplificados são depositados nos ângulos certos das linhas dos oligoespaçadores e a presença de um espaçador é revelada por um ponto de inserção dos oligonucleotídeos e as linhas de amplificação, usando um método químico (reagentes de quimioluminescência - peroxidase e luminol). E em seguida a documentação é feita em filme radiográfico e a revelação com reagentes para radiografia.

- Amplificação do locus DR

Foram realizadas reações de 50µL, contendo tampão de reação, dNTP (1,25mM cada), 20pmol de cada oligonucleotídeo, 50mM de KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5mM de MgCl₂, iniciadores (Dra 5'-GGGTTTGGGTCTGACGAC-3', biotinado em 5'; DRb 5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'), 1,25 unidades de TAQ polymerase (1,0µL) e 5µL do DNA em estudo (Quadro 5) e os DNAs cromossomais de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 e *M. bovis* BCG.

Quadro 5 – Volumes em μL dos reagentes utilizados para a amplificação da Região DR das micobactérias, na técnica de *Spoligotyping* - São Paulo - 2013

Reagente	Volume/amostra (μL)
Água ultra pura	31,25
Buffer	5,0
MgCl ₂ 50 mM	2,5
Pool dNTPs 1,25 mM	8,0
Primer DRA 10 pmol/ μL	1,0
Primer DRB 10 pmol/ μL	1,0
Taq DNA-Polimerase (1,25U)	0,25
DNA extraído	1,0
TOTAL	50,0

O programa do PCR consiste em:

- desnaturação inicial - 96°C, por 3 minutos;
- desnaturação do DNA - 96°C, por 1 minuto, 30 vezes do ciclo de amplificação;
- anelamento - 55°C, por 1 minuto, 30 vezes do ciclo de amplificação;
- extensão - 72°C, por 30 segundos, 30 vezes do ciclo de amplificação;
- extensão final - 72°C, por 10 minutos.

- Hibridização com a membrana e revelação

Após a amplificação, 20 μL do produto de PCR foi adicionado em 180 μL de 2 x SSPE/0,1%SDS (20 x SSPE: 0,2M de Na₂HPO₄, 3,6M de NaCl; 20mM de EDTA) e desnaturado a 99°C, por 15 minutos e, em seguida, foi colocado em gelo imediatamente para não haver reassociação das fitas.

A membrana (contendo as 43 sequências correspondentes aos espaçadores conhecidos na região DR) foi sensibilizada, lavando-a com 2 x SSPE/0,1% de SDS a 60°C por 5 minutos e ajustada no miniblotter de maneira a ficar com a linha de aplicação das sondas perpendiculares à aplicação das amostras.

Aplicadas as amostras, a hibridização foi feita a 60°C por um período de 60 minutos, logo após foi feita a aspiração dos fluidos da miniblotter e lavou-se a membrana duas vezes com 2 x SSPE/0,5% de SDS por 10 minutos a 60°C.

A membrana foi resfriada em uma bolsa de hibridização, onde é incubada com o conjugado streptavidina-peroxidase diluída em 2 x SSPE/0,5, a 42°C por 60 minutos. Após o resfriamento, lavou-se a membrana duas vezes em 2 x SSPE/0,5% de SDS, por 10 minutos a 42°C, seguido de mais duas lavagens em temperatura ambiente com 2 x SSPE.

A membrana foi incubada com os reagentes de quimioluminescência (peroxidase e luminol) (ECL Amersham Pharmacia®). E em seguida, a documentação foi feita em filme radiográfico e a revelação com reagentes para radiografia.

4.3.5 Variable Number Tandem Repeat (VNTR)

A tipagem pelo MIRU-VNTR detecta, através da verificação do tamanho dos produtos amplificados, o número de repetições dos loci. Os produtos amplificados são separados por eletroforese em géis de agarose e pela análise do tamanho destes fragmentos é verificado, e calculado o número de alelos. Com base nos resultados de um estudo realizado por Rocha et al. (2013), onde foram identificados os diferentes poderes discriminatórios dos diferentes loci de VNTR, em isolados de *M. bovis*, foram selecionados, para este experimento, um conjunto de primers específicos para três MIRUs (16, 26 e 27) e três ETRs (A, B e C).

Foram realizadas reações de 50µL, sendo 10µL de 5 x Green Taq Reaction Buffer 8,5 pH; 7,5 mM MgCl₂ (Promega); 1,25mM Pool dNTPs; Taq platinum DNA-polimerase (1,25U), 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 1,0µL de DNA da amostra em estudo (Quadro 6) e o DNA da amostra de *M. bovis* AN5, como controle.

Quadro 6 – Volumes em µL dos reagentes utilizados para a amplificação dos loci de MIRU e ETR - São Paulo - 2013

Reagente	Volume/amostra (µL)
Água ultra pura	30,75
Buffer Verde	10,0
Pool dNTPs 1,25 mM	4,0
Primer-1 10 pmol/µL	2,0
Primer-2 10 pmol/µL	2,0
Taq Polimerase (1,25U)	0,25
DNA extraído	1,0
TOTAL	50,0

O ciclo do PCR empregado será:

- desnaturação inicial - 95°C por 3 minutos;
- desnaturação do DNA - 94°C por 1 minuto, 40 vezes do ciclo de amplificação;
- anelamento - temperatura variável de acordo com os loci em estudo (Quadro 7) por 1 minuto, mais 40 vezes do ciclo de amplificação;

- extensão - 72°C, por 40 segundos, mais 40 vezes do ciclo de amplificação;
- extensão final - 72°C, por 15 minutos.

A revelação do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose de 1,5% a 2% (p/v), usando-se tampão de corrida TBE (0,04M Tris-acetato e 0,001M EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados na solução de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain em substituição ao brometo de etídio. A visualização e a documentação foram feitas pelo sistema de fotodocumentação automático AlphaImager®.

Quadro 7 – MIRUs e ETRs estudados, segundo os pesos moleculares dos loci, os primers utilizados na amplificação e a temperatura de anelamento - São Paulo - 2013

MIRU	Tamanho da unidade de repetição (bp)	Sequências dos primers	Temperatura de anelamento em °C
MIRU 16 MIRU 16-1	53	5' TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA 3' 5' CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC 3'	58
MIRU 26 MIRU 26-1	51	5' TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC 3' 5' CATAGGCGACCAGGCGAATAG 3'	52
MIRU 27 MIRU 27-1	53	5' TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA 3' 5' GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA 3'	57
ETR A ETR A-1	75	5' AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT 3' 5' CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT 3'	51
ETR B ETR B-1	57	5' ATGGCCACCCGATAACCGCTTCAGT 3' 5' CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC 3'	58
ETR C ETR C-1	58	5' CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT 3' 5' AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA 3'	53

Para identificar o número de alelos de cada locus de VNTR utilizamos a quadro 8.

Quadro 8 – Número de alelos segundo o VNTR e o peso molecular (pares de bases) do amplificado - São Paulo - 2013

LOCUS	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MIRU 16	565	618	671	724	777	830	883	936	989	1042	1095	1148	1201	1254	1307	1360
MIRU 26	285	336	387	438	489	540	591	642	693	744	795	846	897	948	999	1050
MIRU 27	498	551	604	657	710	763	816	869	922	975	1028	1081	1134	1187	1240	1293
ETR-A	195	270	345	420	495	570	645	720	795	870	945	1020	1095	1170	1245	1320
ETR-B	121	178	235	292	349	406	463	520	577	634	691	748	805	862	919	976
ETR-C	206	264	322	380	438	496	554	612	670	728	786	844	902	960	1018	1076

4.3.6 Tratamento das amostras

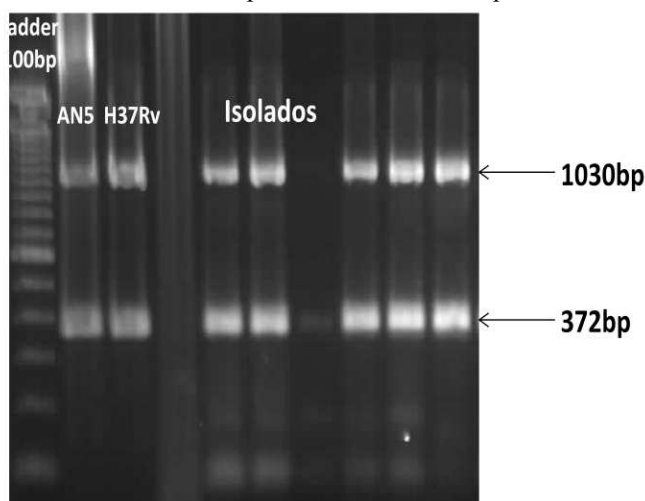
Um dendrograma pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) foi construído utilizando-se a tipagem pelos VNTRs, com o programa PAUP*4b10 (SWOFFORD, 2000).

5 RESULTADOS

5.1 TB MULTIPLEX PCR

Foram analisadas 448 amostras pelas técnicas de *TB Multiplex PCR*. Destas, 434 amostras foram classificadas como sendo do gênero *Mycobacterium* e como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. A figura 1 mostra o resultado de isolados ensaiados com a técnica *TB Multiplex PCR*. A banda de 1030bp corresponde ao Gênero *Mycobacterium* e a banda de 372bp ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

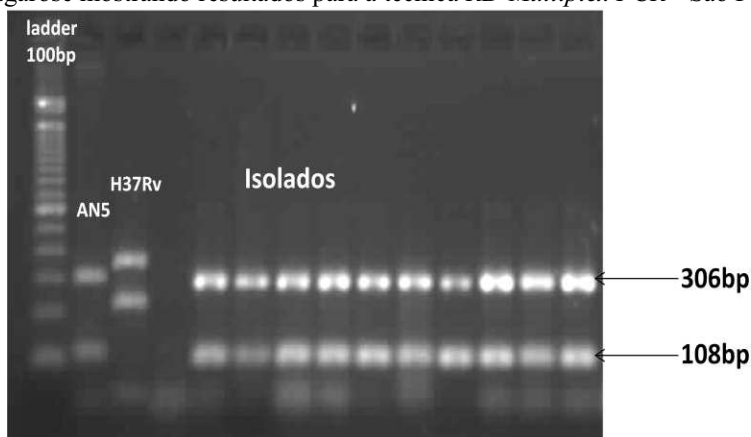
Figura 1 – Gel de agarose mostrando resultados para a técnica *TB Multiplex PCR* - São Paulo – 2013



Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

5.2 RD MULTIPLEX PCR

Se a amostra era identificada como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* pela técnica de *TB Multiplex PCR*, esta era testada pelo *RD Multiplex PCR* (RD9 e RD12). A figura 2 mostra os resultados de isolados ensaiados com a técnica *RD Multiplex PCR*. Os produtos da amplificação referente a região RD12 é de 306bp e à região RD9 é de 108bp, identificando as amostras como *Mycobacterium bovis*.

Figura 2 – Gel de agarose mostrando resultados para a técnica *RD Multiplex PCR* - São Paulo - 2013

Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

5.3 SPOLIGOTYPING

Com o método de *Spoligotyping* para a tipagem de 429 amostras de *M. bovis* obtiveram-se 43 diferentes perfis de espoligotipos (Tabela 1). Os majoritários foram o SB0121 (0,333%), seguido pelo SB0295 (0,205%), SB1380 (0,075%), SB0140 (0,058%), PERFIL 1 (0,049%) e SB1050 (0,037%). Além destes perfis mais frequentes, outros 17 espoligotipos formaram agrupamentos e outros 17 resultaram em perfis únicos. Dentre estas amostras analisadas, foram identificados três espoligotipos que ainda não foram relatados anteriormente (segundo notação internacional - www.mbovis.org), e um deles (PERFIL 1) apresentou elevada frequência, quadro 9. Em seis amostras não foi possível a identificação fidedigna dos perfis.

Tabela 1 – Ocorrência de espoligotipos das 429 amostras de *M. bovis* estudadas - São Paulo - 2013

<i>Espoligotipo</i>	<i>Ocorrência</i>	
	<i>(número de isolados)</i>	<i>(%)</i>
SB0121	143	33,33%
SB0295	88	20,51%
SB1380	32	7,46%
SB0140	25	5,83%
PERFIL 1*	21	4,90%
SB1050	16	3,73%
SB1897	8	1,86%
SB0881	7	1,63%
SB1033	7	1,63%

SB1093	7	1,63%
SB1136	6	1,40%
SB1144	6	1,40%
N/D**	6	1,40%
SB0120	5	1,17%
SB0333	4	0,93%
SB0130	4	0,93%
PERFIL 2*	3	0,70%
PERFIL 3*	3	0,70%
SB1137	3	0,70%
SB0125	3	0,70%
SB1369	3	0,70%
PERFIL 4*	2	0,47%
SB1016	2	0,47%
SB0123	2	0,47%
SB0132	2	0,47%
SB0267	2	0,47%
SB1142	2	0,47%
SB0153	1	0,23%
SB0329	1	0,23%
SB0822	1	0,23%
SB0870	1	0,23%
SB1035	1	0,23%
SB1135	1	0,23%
SB1139	1	0,23%
SB1145	1	0,23%
SB1146	1	0,23%
SB1190	1	0,23%
SB1308	1	0,23%
SB1359	1	0,23%
SB1388	1	0,23%
SB1413	1	0,23%
SB1672	1	0,23%
SB1869	1	0,23%
SB2043	1	0,23%
Total	429	100%

*perfis ainda sem registros, com base no banco de dados internacional (www.mbovis.org)

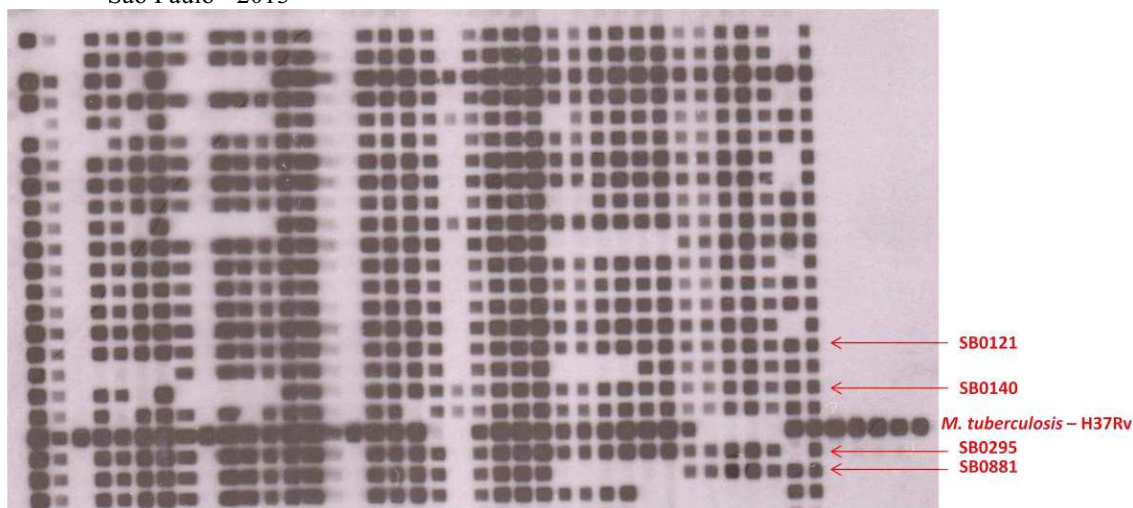
**perfis não identificados

Quadro 9 – Novos espoligotipos com seus respectivos perfis - São Paulo - 2013

<i>Espoligotipo</i>	<i>Perfil do espoligotipo</i>
PERFIL 1	110110010111111011110111100001111111100000
PERFIL 2	0101111101111110111101111111100000111100000
PERFIL 3	11010000001111101111011111111111111111000000
PERFIL 4	110100000011111011110111111111111111111000000

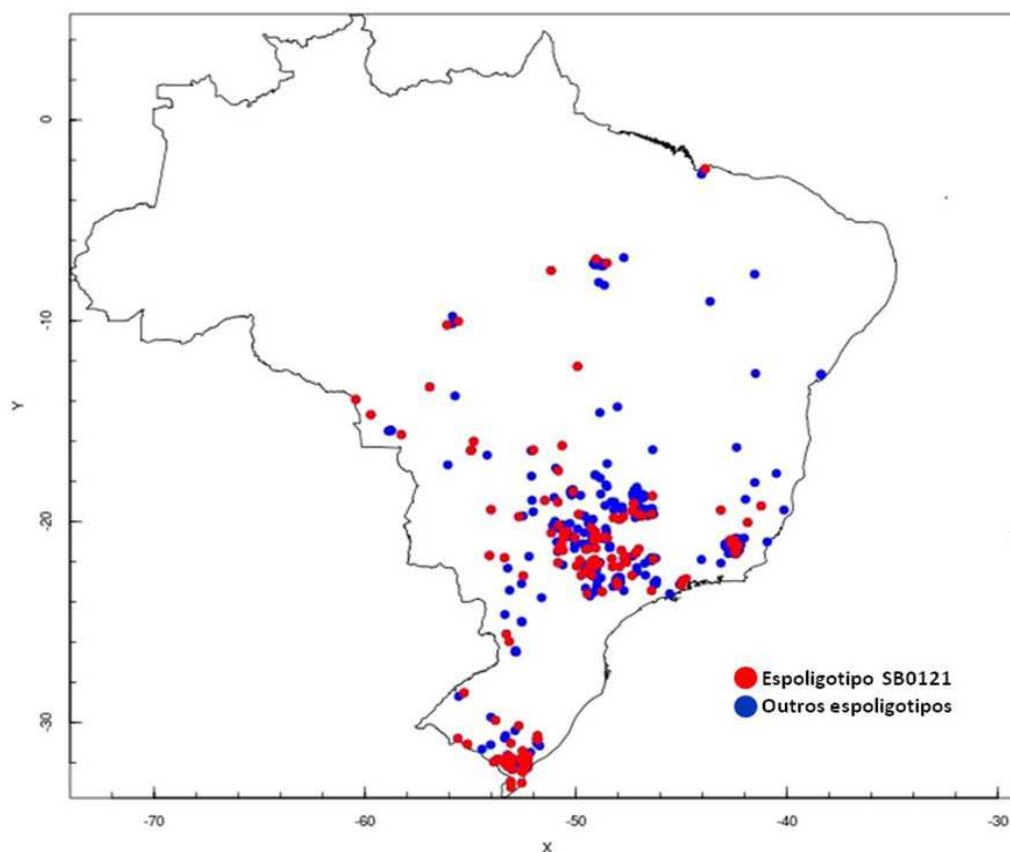
A figura 3 traz os resultados do método *Spoligotyping*, com destaque para os espoligotipos SB0121, SB0140, SB0295 e SB 0881, e também para a amostra padrão H37Rv de *M. tuberculosis*. E a figura 11, a distribuição geográfica das amostras no Brasil, com destaque para o espoligotipo SB0121.

Figura 3 – Resultado do *Spoligotyping* com exemplos dos espoligotipos SB0121, SB0140, SB0295 e SB0881 - São Paulo - 2013



Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

Figura 4 – Mapa temático com a distribuição geográfica do espoligotipo SB0121 no Brasil - São Paulo - 2013

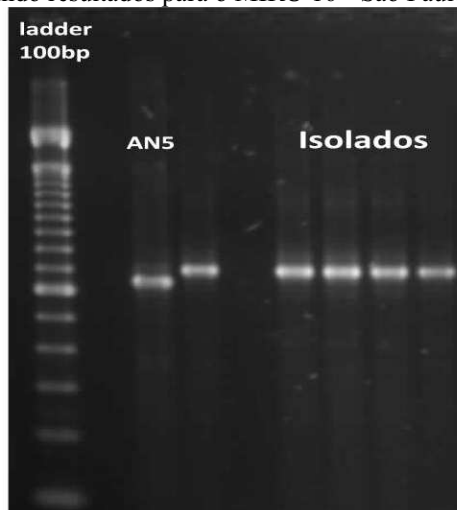


Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

5.4 MIRU E ETR

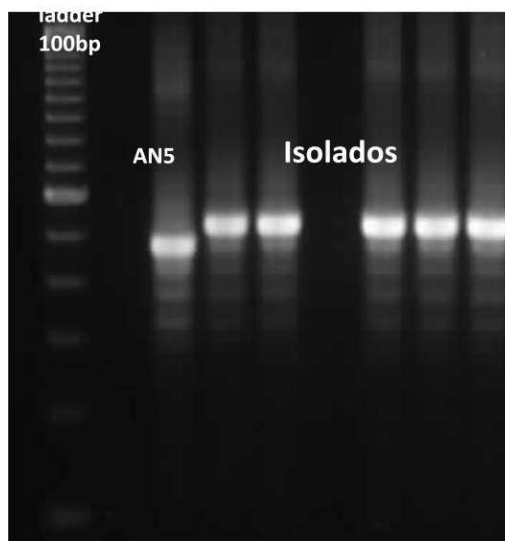
As figuras 5 a 10 mostram os resultados dos loci de VNTR para a tipagem dos isolados de *M. bovis*.

Figura 5 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 16 - São Paulo – 2013



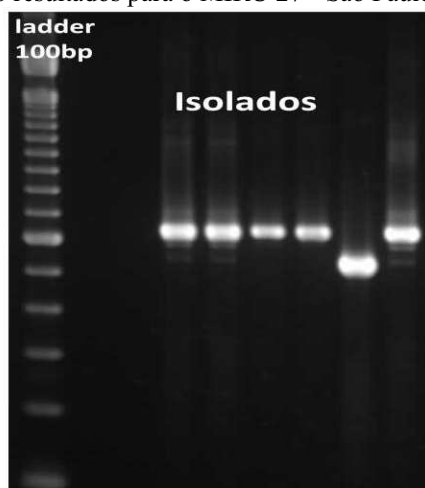
Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

Figura 6 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 26 - São Paulo – 2013



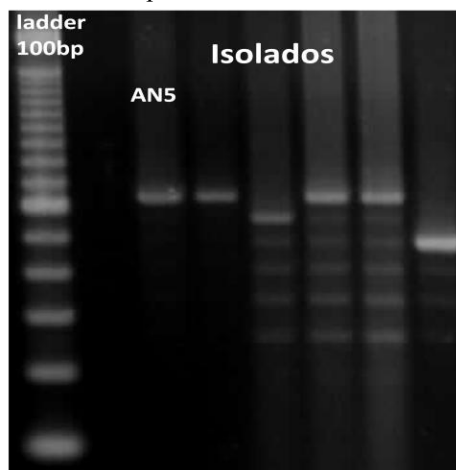
Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

Figura 7 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 27 - São Paulo – 2013



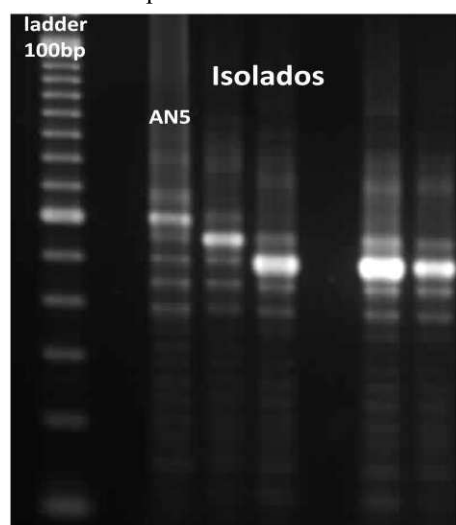
Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

Figura 8 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR A - São Paulo – 2013



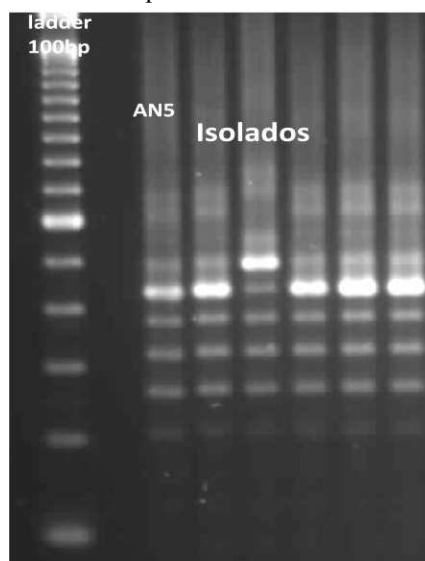
Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

Figura 9 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR B - São Paulo – 2013



Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

Figura 10 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR C - São Paulo – 2013



Fonte: (ROCHA, V. C. F., 2013).

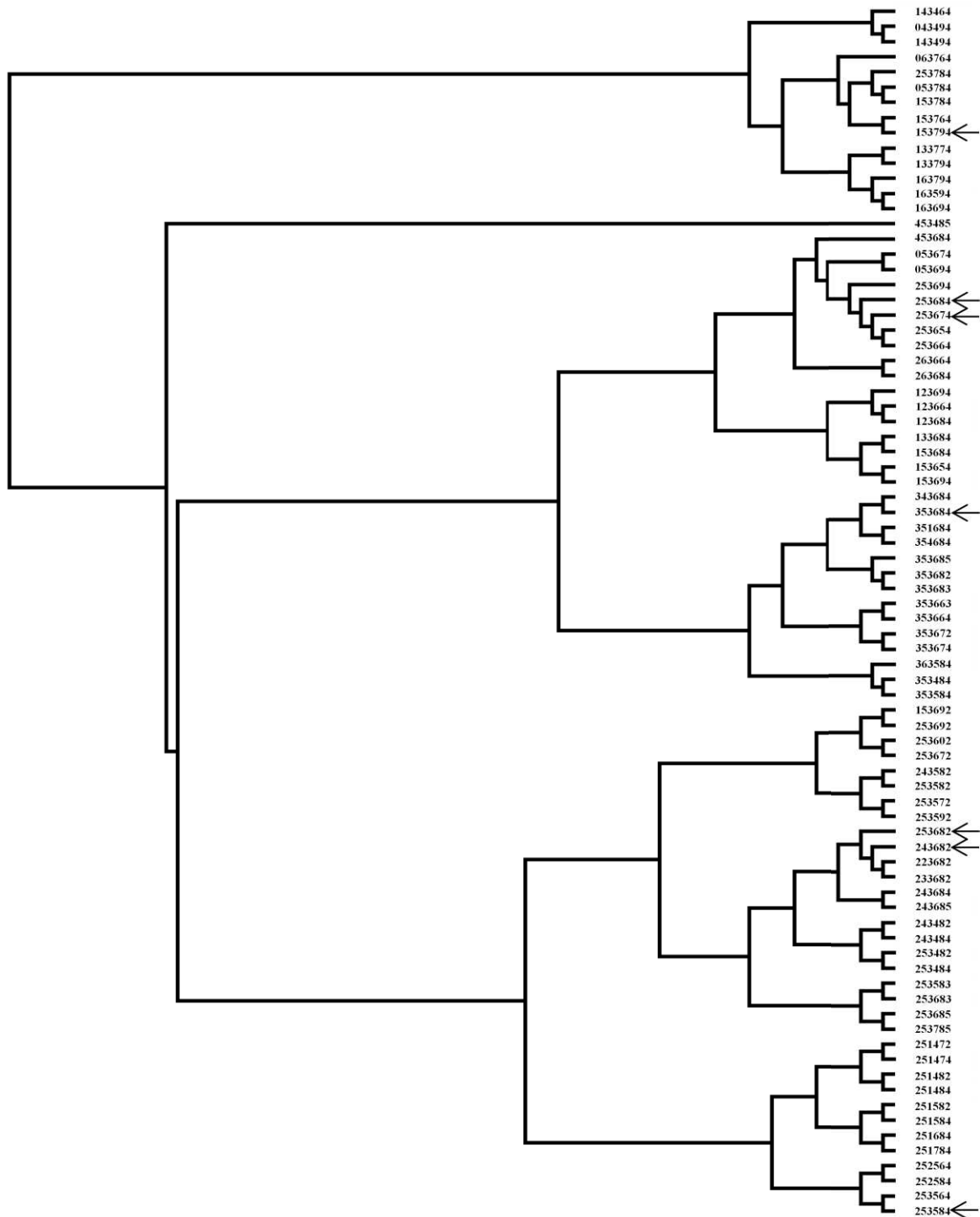
A tipagem de 434 isolados de *M. bovis* pelos MIRUs e ETRs resultou em 80 diferentes perfis (Tabela 2). Um dendograma baseado nos perfis resultantes dos seis loci de VNTR estudados foi gerado, usando o método de UPGMA (Figura 11).

Tabela 2 – Ocorrência de perfis das 434 amostras de *M. bovis*, gerados pelos VNTRs - São Paulo - 2013

<i>Perfis</i>	<i>Ocorrências</i>	
	<i>(número de isolados)</i>	<i>(%)</i>
253684	96	22,12%
253682	55	12,67%
353684	25	5,76%
253674	23	5,30%
253584	20	4,61%
243682	19	4,38%
153794	14	3,23%
243684	11	2,53%
253582	10	2,30%
253482	9	2,07%
163794	8	1,84%
251482	8	1,84%
253664	7	1,61%
143494	6	1,38%
252584	6	1,38%
253572	6	1,38%
253672	6	1,38%
353584	5	1,15%
251584	4	0,92%
253685	4	0,92%
253784	4	0,92%
353484	4	0,92%
123684	3	0,69%
123694	3	0,69%
153684	3	0,69%
153694	3	0,69%
243582	3	0,69%
243685	3	0,69%
251784	3	0,69%
263684	3	0,69%
343684	3	0,69%
133794	2	0,46%
153692	2	0,46%
243482	2	0,46%
251484	2	0,46%
253484	2	0,46%
253654	2	0,46%
253694	2	0,46%
353683	2	0,46%
43494	1	0,23%
53674	1	0,23%
53694	1	0,23%

53784	1	0,23%
63764	1	0,23%
123664	1	0,23%
133684	1	0,23%
133774	1	0,23%
143464	1	0,23%
153654	1	0,23%
153764	1	0,23%
153784	1	0,23%
163594	1	0,23%
163694	1	0,23%
223682	1	0,23%
233682	1	0,23%
243484	1	0,23%
251472	1	0,23%
251474	1	0,23%
251582	1	0,23%
251684	1	0,23%
252564	1	0,23%
253564	1	0,23%
253583	1	0,23%
253592	1	0,23%
253602	1	0,23%
253683	1	0,23%
253692	1	0,23%
253785	1	0,23%
263664	1	0,23%
351684	1	0,23%
353663	1	0,23%
353664	1	0,23%
353672	1	0,23%
353674	1	0,23%
353682	1	0,23%
353685	1	0,23%
354684	1	0,23%
363584	1	0,23%
453485	1	0,23%
453684	1	0,23%
Total	434	100%

Figura 11 - Dendrograma pelo método UPGMA mostrando os grupamentos das amostras de *M. bovis* segundo MIRU-VNTR, com destaque para os perfis mais frequentemente encontrados nas amostras analisadas - São Paulo - 2013



5.5 COMPARAÇÃO DA DISCRIMINAÇÃO DAS TÉCNICAS

A tabela 3 mostra o resultado da comparação do número de perfis resultantes dos métodos de tipagem dos isolados, aplicados nas amostras de *M. bovis* estudadas.

Tabela 3 – Comparação da discriminação das técnicas de *Spoligotyping* e VNTR, com base no número de perfis resultantes - São Paulo - 2013

<i>Variáveis</i>	<i>Método para tipagem</i>	
	<i>Spoligotyping</i>	<i>MIRU-VNTR</i>
Perfis (total) (n)	43	80
Perfis individuais (n)	17	41
Perfis agrupados (n)	26	39
Tamanho dos agrupamentos (n)	2-143	2-96

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, pôde-se identificar que os espoligotipos mais abundantes no Brasil foram o SB0121, seguido pelo SB0295, SB1380, SB0140 e SB1050. Além destes, um perfil inédito apresentou muitas ocorrências entre as amostras analisadas.

Dentre as amostras identificadas, o espoligotipo mais frequente e mais disperso foi o SB0121 (com 33,33%). Em vários estudos, este espoligotipo foi detectado no Brasil, na Bélgica, na França e na Argélia (ZUMÁRRAGA et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2004; HADDAD et al., 2001; SAHRAOUI et al., 2009); sendo que, na Espanha, México, Portugal e Brasil foi o espoligotipo mais predominante (ARANAZ et al., 1996; COBOS-MARIN et al., 2005; DUARTE et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2010; PARREIRAS et al. 2012; ROCHA et al., 2013).

Acredita-se que o SB0121 representa um grupo heterogêneo, com diversas linhagens genéticas. De acordo com Rodríguez et al. (2010), as razões para a abundância do SB0121 ainda não estão bem definidas; consideram que de um lado, as cepas com este padrão de espoligotipo podem ter uma vantagem evolutiva sobre as outras cepas, por outro lado, é possível que a técnica de *spoligotyping* tenha baixo poder discriminatório para distinguir as diferenças genéticas dessas cepas. Além disso, Rodríguez et al. (2010) afirmam que, uma vez que a evolução da região de repetição direta (DR) é unidirecional, ocorrendo por deleções de espaçadores individuais ou de perda de sequências de espaçadores contíguos, pode-se considerar que o SB0120 (BCG-like) é o antepassado comum, a partir do qual o SB0121 evoluiu pela perda do espaçador 21, dando origem a uma diversidade populacional de *M. bovis*. O bovino foi domesticado no início do período Neolítico e estudos baseados no DNA mitocondrial descrevem a propagação do gado do Mediterrâneo (Fertile Crescent) para a Europa e daí para as suas rotas terrestres e marítimas. No entanto, desconhece-se como a infecção com *M. bovis*, ou mesmo da estirpe ancestral SB0120 (BCG-like), espalhou-se juntamente com a expansão do gado. Este espoligotipo é o mais frequente na França, também já foi identificado na Bélgica, China, Dinamarca, Iran, Japão, Portugal, Rússia, África do Sul, Espanha, Sri Lanka, Holanda, Argélia e Brasil (ARANAZ et al., 1996; COSTA et al., 2010; KREMER et al., 1999; van EMBDEN et al., 2000; HADDAD et al., 2001; SAHRAOUI et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2012; PARREIRAS et al. 2012; ROCHA et al., 2013).

O segundo espoligotipo mais frequentemente encontrado, o SB0295, perfazendo 20,51% das amostras analisadas, já foi descrito na Holanda (HADDAD et al., 2001) e no

Brasil, em diferentes estudos, já foi identificado como o mais frequente (ZANINI et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2004; PARREIRAS et al. 2012; ROCHA et al., 2013).

Outro espoligotipo identificado como um dos mais frequentes neste trabalho, o SB1380 (7,46%), também já foi identificado na Espanha (RODRÍGUEZ et al., 2010). Contudo, este é o primeiro relato de identificação deste espoligotipo no Brasil.

O espoligotipo SB0140, representando 5,83% da frequência encontrada nesta pesquisa, é considerado como o mais predominante na Austrália, na Argentina, na Irlanda e no Reino Unido (COUSINS et al., 1998; ZUMÁRRAGA et al., 1999; COSTELLO et al., 1999; HADDAD et al., 2001). E de acordo com Rodriguez et al. (2004), parece estar bastante difundido na América Latina, pois já foi descrito no Paraguai, Uruguai, Brasil, México e Argentina (ZUMÁRRAGA et al., 1999; RODRIGUEZ et al, 2004; COBOS-MARIN et al., 2005; ROCHA et al., 2013).

O quinto espoligotipo, SB1050 também já foi relatado nas Américas, sendo identificado na Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai, México e Costa Rica (HADDAD et al., 2001; NASCIMENTO, 2008).

Além destes espoligotipos que se apresentaram como mais frequentes nas amostras estudadas, outros 34 espoligotipos também foram identificados, muitos dos quais nunca foram relatados no Brasil e três novos perfis foram encontrados. Apesar da diversidade de espoligotipos encontrados, há predominância de alguns deles, corroborando com estudos realizados em diversos países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, México e Venezuela), onde 1684 isolados de *M. bovis* obtidos de diversas espécies de animais domésticos e silvestres foram tipificados pela técnica de *Spoligotyping*. Relata-se neste estudo que há uma grande variedade de espoligotipos nestes países, no entanto, há perfis majoritários entre os países vizinhos. Estes agrupamentos podem refletir uma transmissão ativa de longa duração ou uma origem histórica comum da distribuição da infecção entre os rebanhos (ZUMÁRRAGA et al., 2013).

No primeiro momento, para a construção do dendograma, foi desconsiderado o número de ocorrências, sendo analisado apenas o grau de similaridade entre os diferentes perfis resultantes dos seis *loci* em estudo. Após a construção icônica do dendograma, verificou-se que os perfis de maior ocorrência estão distribuído em diferentes regiões do país.

Com base na comparação do número de ocorrências dos perfis resultantes da tipificação pelos métodos de *Spoligotyping* e VNTR, este último método foi superior na capacidade de discriminar isolados de *M. bovis*, resultando em 80 perfis contra 43. Além disso, foi possível a identificação de 39 agrupamentos com variação de tamanho de duas a 96

amostras (perfil 253684), o que pode sugerir uma fonte de infecção primária e comum entre estas amostras de mesmo perfil (Tabela 3).

Os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam e atualizam estudos anteriores (ROCHA et al., 2013) que afirmam que o método de MIRU-VNTR possui maior poder discriminatório quando em comparação com outras técnicas moleculares para discriminação de *M. bovis*.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, os espoligotipos mais abundantes foram o SB0121, o qual apresentou-se amplamente distribuído entre as amostras, seguido pelo SB0295, SB1380, SB0140 e SB1050.

O espoligotipo SB1380, até então detectado apenas na Espanha, foi identificado como o sexto mais frequentemente isolado.

Paralelamente a estes achados, foram detectados quatro perfis ainda inéditos na literatura, sendo que um deles foi o terceiro mais frequentemente isolado neste estudo.

A tipagem pelo MIRU-VNTR revelou-se superior ao Spoligotyping para discriminar os isolados de *M. bovis*, resultando em 80 perfis contra 43, além disso, foram identificados 39 agrupamentos, com variação de duas a 96 amostras.

Os achados obtidos pela análise do dendograma revelaram que os perfis de maior ocorrência estão distribuídos em diferentes regiões do país.

As metodologias moleculares de identificação de micobactérias e de discriminação de isolados de *M. bovis*, aliadas a análises epidemiológicas, podem melhorar a performance de sistemas de vigilância para tuberculose bovina.

REFERÊNCIAS

- ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONALEZ, O.; RODRIGUEZ-FERRI, E. F.; BUNSCHOTEN, A.; VAN EBDEN, 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.
- BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1149-1156, 2003.
- BAILEY, T.; GATRELL, A. C. **Interactive spatial data analysis**. Harlow: Prentice Hall, 1995. 413 p.
- BEHR, M. A.; WILSON, M. A.; GILL, W. P.; SALAMON, H.; SCHOOLNIK, G. K.; RANE, S.; SMALL, P. M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray. **Science**, v.284, p.1520-1523, 1999.
- 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.; 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.; KÄLLENIOUS, 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.
- BIER, O. Micobactérias. **Bacteriologia e imunologia**, 19. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1978. p. 585-610.
- BONARD, D.; MSELLATI, P.; RIGOUTS, L.; COMBE, P.; COULIBALY, D.; COULIBALY, I. M.; PORTAELS, F. What is the meaning of repeated isolation of *Mycobacterium africanum*? **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, p. 1176-1180, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. Brasília, 2009.
- BREMER-MELHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2350-2351, 1999.
- BROSCH, R.; GORDON, S. V.; BILLAULT, A.; GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; SORAVITO, C.; BARRELL, B. G.; COLE, S. T. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 2221-2229, 1998.

- 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**, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.
- BUARD, J.; JEFFREYS, A. J. Big, bad minisatellites. **Nature Genetics**, v. 15, p. 327-328, 1997.
- CARPENTER, T. E. Methods to investigate spatial and temporal clustering in veterinary epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 48, n. 4, p. 303-320, 2001.
- COBOS-MARÍN, L.; MONTES-VARGAS, J.; ZUMARRAGA, M.; CATALDI, A.; ROMANO, M. I.; ESTRADA-GARCIA, I.; GONZALEZ-Y-MERCHAND, J. A. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 996-1000, 2005.
- COLE, S. T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology**, v. 148, p. 2919-2928, 2002.
- CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 53-63, 1994.
- COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J., RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K.; DE KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 59-70, 1998.
- COSTA, A. C. F.; SILVA, N. S.; ROCHA, V. C. M.; ROSALES RODRIGUEZ, C. A.; ESTRELA-LIMA, A.; MOREIRA, E. L. T.; MADRUGA, C.; ARRUDA, S. M.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, M. C. A.; OLIVEIRA, E. M. D. Tipificação genética, através da técnica de spoligotyping, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 233-237, 2010.
- COSTELLO, E.; O'GRADY, D.; FLYNN, O.; O'BRIEN, R.; ROGERS, M.; QUIGLEY, F.; EGAN, J.; GRIFFIN, J. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3217-3222, 1999.
- COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.; ZUMÁRRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1305-1314, 2003.
- COUSINS, D.; WILLIAMS, S.; LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; BUNSCHOTEN, A.; VAN EMBDEN, J. V.; ELLIS, T. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 168-178, 1998.

COX, R.; MIRKIN, S. M. Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences – USA**, v. 94, p. 5237-5242, 1997.

DIAMOND, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, v. 418, p. 700-707, 2002.

DJELOUADJI, Z.; ARNOLD, C.; GHARBIA, S.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Multispacer Sequence Typing for *Mycobacterium tuberculosis* Genotyping. **PLoS ONE**, v.3, n.6, p.2433.

DRANCOURT, M. A. Single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. **Distribution**, v. 2, n. 6, p.1-8, 2008.

DUARTE, E. L.; DOMINGOS, M.; AMADO, A.; BOTELHO, A. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 415-421, 2008.

EISENACH, K. D.; CRAWFORD, J. T.; BATES, J. H. Genetic relatedness among strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Analysis of restriction fragment heterogeneity using cloned DNA probes. **American Review of Respiratory Disease**, v. 133, p. 1065-1068, 1986.

ELLIOT, P.; CUZICK, J.; ENGLISH, D.; STERN, R. **Geographical & environmental epidemiology**. Oxford: Oxford University Press, 1992. 382 p.

EPPLEN, C.; SANTOS, E. J.; MAUELER, W.; VAN HELDEN, P.; EPPLEN, J. T. On simple repetitive DNA sequences and complex diseases. **Electrophoresis**, v. 18, p. 1577-1585, 1997.

ESRI INC. **Arc View GIS version 3.1**. Redlands, 1996. 1 CD-Rom.

FIGUEIREDO, E. E. S.; RAMOS, D. F.; MEDEIROS, L.; SILVESTRE, F. G.; LILENBAUM, W.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F.; DELLAGOSTIN, O.A. Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 296-298, 2012.

FILLIOL, I.; FERDINAND, S.; NEGRONI, L.; SOLA, C.; RASTOGI, N. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on Variable Number of Tandem DNA Repeats used alone and in association with Spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2520-2524, 2000.

FROTHINGHAM, R.; HILLS, H. G.; WILSON, K. H. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1639-1643, 1994.

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

GILBERT, M.; MITCHELL, A.; BOURN, D.; MAWDSLEY, J.; CLIFTON-HADLEY, R.; WINT, W. Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain Periodical. **Nature**, v. 435, p. 491-496, 2005.

- GORDON, S. V.; BROSCHE, R.; BILLAULT, A.; GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; COLE, S. T. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 643-655, 1999.
- GOYAL, M.; YOUNG, D.; ZHANG, Y.; JENKINS, P. A.; SHAW, R. J. PCR amplification of variable sequence upstream of katG gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 3070-3071, 1994.
- GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R.; FABRE, M.; OMAIS, B.; MARMIESSE, M.; SUPPLY, P.; VINCENT, V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog**, v. 1, p. 55, 2005.
- HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. **Research in Veterinary Science**, v. 76, p. 1-18, 2004.
- HADDAD, N.; OSTYN, A.; KAROUI, C.; MASSELOT, M.; THOREL, M. F.; HUGHES, S. L.; INWALD, J.; HEWINSON, R. G.; DURAND, B. Spoligotype Diversity of *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in France from 1979 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3623-3632, 2001.
- HERMANS, P. W.; VAN SOOLINGEN, D.; BIK, E. M.; DE HAAS, P. E.; DALE, J. W.; VAN EMBDEN, J. D. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG isolated in a hot-spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* complex strain. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 2695-2705, 1991.
- HILTY, M.; DIGUIMBAYE, C.; SCHELLING, E.; BAGGI, F.; TANNER, M.; ZINSSTAG, J. Evaluation of the discriminatory power of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 217-222, 2005.
- HUARD, R. C.; LAZZARINI, L. C. O.; BUTLER, W. R.; VAN SOOLINGEN, D.; HO, J. L. A PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1637-1650, 2003.
- HUARD, R. C.; FABRE, M.; de HAAS, P.; LAZZARINI, L. C. O.; VAN SOOLINGEN, D.; COUSINS, D.; HO, J. L. Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 12, p. 4271-4287, 2006.
- JEFFREYS, A. J.; TAMAKI, K.; MACLEOD, A.; MONCKTON, A.; NEIL, D. L.; ARMOUR, J. A. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. **Nature Genetics**, v. 6, p. 136-145, 1994.
- 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**, n. 35, p. 907-914, 1997.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 781-791, 2003.

KREMER, K.; VAN SOOLIGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2607-2618, 1999.

LARI, N.; BIMBI, N.; RINDI, L.; TORTOLI, E.; GARZELLI, C. Genetic diversity of human isolates of *Mycobacterium bovis* assessed by Spoligotyping and Variable Number Tandem Repeat genotyping. **Infection, Genetics and Evolution**, 2010,

LE FLETCHER, P.; HAUCK, Y.; ONTENIENTE, L.; PRIEUR, A.; DENOEUD, F.; RAMISSE, V.; SYLVESTRE, P.; BENSON, G.; RAMISSE, F.; VERGNAUD, G. A tandem repeats database for bacterial genomes: applications to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BCM Microbiology**, v. 1, p. 2, 2001.

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

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

MOSTOWY, S.; COUSINS, D.; BRINKMAN, J.; ARANAZ, A.; BEHR, M. A. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 74-80, 2002.

MÜLLER, B.; HILTY, M.; BERG, S.; GARCIA-PELAYO, M. C.; DALE, J.; BOSCHIROLI, M. L.; CADMUS, S.; NGANDOLO, B. N.; 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.; KÄLLENIOUS, 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.

MÜLLER, B.; STEINER, B.; BONFOH, B.; FANÉ, A.; SMITH, N. H.; ZINSSTAG, J. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 26, 2008.

MYERS, J. A.; STEELE, J. H. **Bovine tuberculosis control in man and animals**. St. Louis, Missouri, USA: Warren H. Green, Inc., 1969.

NASCIMENTO, T. F. **Avaliação de marcadores genéticos para tipagem de *Mycobacterium bovis***. 2008. 40 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Veterinária) –

Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-Rio de Janeiro, 2008.

NAKAMURA, Y.; CARLSON, M.; KRAPCHO, K.; KANAMORI, M.; WHITE, R. New approach for isolation of VNTR markers. **American Journal of Human Genetic**, v. 43, p. 854-859, 1988.

NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v. 253, p. 1616-1622, 1987.

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 152-157, 2000.

PARREIRAS, P. M.; ANDRADE, G. I.; DO NASCIMENTO, T. F.; OELEMANN, M. C.; GOMES, H. M.; DE ALENCAR, A. P.; DE ASSIS, R. A.; MOTA, P. M. P. C.; PEREIRA, M. A. S.; LOBATO, F. C. F.; LAGE, A. P.; SUFFYS, P. N. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1 p. 64-73, 2012.

RENWICK, A. R.; WHITE, P. C.; BENGIS, R. G. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. **Epidemiology & Infection**, v. 135, p. 529-540, 2007.

ROCHA, V. C. F.; DE FIGUEIREDO, S. C.; ROSALES, C. A. R.; GRISI FILHO, J. H. 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, 2013.

RODRIGUEZ, C. A. R.; ZUMÁRRAGA, M. J.; OLIVEIRA, E. M. D.; CATALDI, A. A.; ROMANO, M. I.; OTTO, H. H.; BONAFÉ, V. L.; FERREIRA NETO, J. S. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de Spoligotyping. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 277-282, jul./set., 2004.

RODRÍGUEZ, S.; ROMERO, B.; BEZOS, J.; DE JUAN, L.; ÁLVAREZ, J.; CASTELLANOS, E.; MOYA, N.; LOZANO, F.; GONZÁLEZ, S.; SÁEZ-LLORENTE, J.L.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; ARANAZ, A. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 141, p. 89-95, 2010.

RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; SCHÜRCH, A. C.; DALE, J.; LOHAN, A. J.; CUNHA, M. V.; BOTELHO, A.; CRUZ, K. D.; 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.

RORING, S. M. M.; SCOTT, A.; BRITAIN, D.; WALKER, I.; HEWINSON, G.; NEIL, S. D.; SKUCE, R. A. Development of Variable-Number Tandem Repeat typing of

Mycobacterium bovis: comparison of results with those obtained by using existing Exact Tandem Repeats and Spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2126-2133, 2002.

ROTHSCHILD, B. M.; MARTIN, L. D. Did ice-age bovids spread tuberculosis? **Naturwissenschaften**, v. 93, p. 565-569, 2006.

SAHRAOUI, N.; MÜLLER, B.; GUETARNI, D.; BOULAHBAL, F.; YALA, D.; OUZROUT, R.; BERG, S.; SMITH, N. H.; ZINSSTAG, J. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 4, 2009. doi:10.1186/1746-6148-5-4. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-5-4.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2013.

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

SMITH, N. H. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 857-65, 2012.

SMITH, N. H.; BERG, S.; DALE, J.; ALLEN, A.; RODRIGUEZ, S.; ROMERO, B.; MATOS, F.; GHEBREMICHAEL, S.; KAROUI, C.; DONATI, C.; MACHADO A. C.; MUCAVELE, C.; KAZWALA, R. R.; HILTY, M.; CADMUS, S.; NGANDOLO, B. N.; 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.; 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.; FERREIRA NETO, J. S.; SURUJBALLI, O.; TADYON, K.; BOTELHO, A.; ZÁRRAGA, A. M.; BULLER, N.; SKUCE, R.; MICHEL, A.; ARANAZ, A.; GORDON, S. V.; JEON, B. Y.; KÄLLENIOUS, 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. 1340-51, 2011.

SMITH, N. H.; DALE, J.; INWALD, J.; PALMER, S.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G.; SMITH, J. M. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 15271-15275, 2003.

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, p. 670-681, 2006.

SOLA, C.; DEVALLOIS, A.; HORGEN, L.; MAÏSETTI, J.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; RASTOGI, N. Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 404-414, 1999.

SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of

Mycobacterium tuberculosis based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3563-3571, 2001.

SUPPLY, P.; MAGDALENA, J.; HIMPENS, S.; LOCHT, C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Molecular Microbiology**, v. 26, p. 991-1003, 1997.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; VAN SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. **Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, 2000.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4127-4138, 1984.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics and Development**, 4, p. 832-837, 1994.

TAYLOR, G. M.; YOUNG, D. B.; MAYS, S. A. Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2236-2240, 2005.

TORGERSON, P.; TORGERSON, D. Benefits of stemming bovine TB need to be demonstrated. **Nature**, v. 457, p. 657, 2009.

VAN BELKUM, A. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 306-311, 1999.

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

VAN EMBDEN, J. D.; VAN GORKOM, T.; KREMER, K.; JANSEN, R.; VAN DER ZEIJST, B. A.; SCHOULS, L. M. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2393-2401, 2000.

VAN DER ZANDEN, A. G. M.; KREMER, K.; SCHOULS, L. M.; CAIMI, K.; CATALDI, A.; HULLEMAN, A.; NAGELKERKE, N. J. D.; VAN SOOLINGEN, D. Improvement of differentiation and interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4628-4639, 2002.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S**. 4. ed. New York: Springer, 2002.

WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M. C.; CHEGE, G. K.; VICTOR, T. C.; HOAL, E. G.; VAN HELDEN, P. D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex

by PCR amplification of genomic regions of difference. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.

WEBB, G. B. Clio Medical: Tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v.215, n.5, p.222, 1936.

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

WIRTH, T.; HILDEBRAND, F.; ALLIX-BEGUEC, C.; WOLBELING, F.; KUBICA, T.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; RÜSCH-GERDES, S.; LOCHT, C.; BRISSE, S.; MEYER, A.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 9, 2008.
DOI:10.1371/journal.ppat.1000160

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control 2009: epidemiology, strategy, financing**. WHO/HTM/TB/2009.411. Geneva, Switzerland: WHO, 2009.

ZANINI, M. S; MOREIRA, E. C; LOPES, M. T. P; OLIVEIRA, R. S; LEÃO, S. C; FIORAVANTI, R. L; ROXO, E; ZUMÁRRAGA, M; ROMANO, M. I; CATALDI, A; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine Lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 96, n. 6, p. 809-813, 2001.

ZHANG, Y.; YOUNG, D. Strain variation in the katG region of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 301-308, 1994.

ZUMÁRRAGA, M. J.; MARTÍN, C.; SAMPER, S.; ALITO, A.; LATINI, O.; BIGI, F.; ROXO, E.; CICUTA, M. E.; ERRICO, F.; RAMO, M. C.; CATALDI, A.; SOOLIGEN, D.; ROMANO, M. I. Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* – related infections in South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 296-303, 1999.

ZUMÁRRAGA, M. J.; ARRIAGA, C.; BARANDIARAN, S.; COBOS-MARÍN, L.; DE WAARD, J.; ESTRADA-GARCIA, I.; FIGUEIREDO, T.; FIGUEROA, A.; GIMÉNEZ, F.; GOMES, H. M.; GONZALEZ-Y-MERCHAND, J. A.; MACÍAS, A.; MILIÁN-SUAZO, F.; RODRÍGUEZ, C. A. R.; SANTILLÁN, M. A.; SUFFYS, P. N.; TRANGONI, M. D.; ZÁRRAGA, A. M.; CATALDI, A. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 9-21, 2013.