VIVIANNE CAMBUÍ MESQUITA ROCHA

Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de *Spoligotyping*, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas

Dissertação 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 Mestre 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
2009

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.2186
FMVZ

Rocha, Vivianne Cambuí Mesquita
Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de *Spoligotyping*, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas / Vivianne Cambuí Mesquita Rocha. – 2009.
97 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2009.

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. ETR. 2. MIRU. 3. *Mycobacterium bovis*. 4. *Spoligotyping*. I. Título.

ERRATA

ROCHA, V. C. M. **Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de *Spoligotyping,* MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas.** 2009. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
RESUMO	2ª	2ª	86 f.	97 p.
ABSTRACT	2ª	2ª	86 f.	97 p.
ABSTRACT	2ª	4ª	Tese	Dissertação

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de spoligotyping e MIRU-VNTR e suas aplicações epidemiológicas", protocolado sob o nº1267/2007, não utilizando animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research "Discrimination in *Mycobacterium bovis* isolated of spoligotyping and MIRU-VNTR and its epidemiological applications", protocol number 1267/2007, under the responsibility Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROCHA, Vivianne Cambuí Mesquita

Título: Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de *Spoligotyping*, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À pesquisadora, Eugenia Márcia de Deus Oliveira, "*in memorian*". Grande amiga e professora, uma das pessoas que mais incentivou o meu crescimento profissional, exemplo de mulher e pesquisadora.

Ao meu amado esposo, Salomão Moreira de Figueiredo, meu incentivo diário na busca do conhecimento e no crescimento humano, meu exemplo de luta e vitória. Sem ele não seria possível o fruto deste trabalho, que foi construído com muita dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, força contínua em minha vida;

Às pessoas que mais desejam o meu crescimento profissional e pessoal: Euler e Raimunda, meus pais amados; Enedir e Edite, minhas irmãs; Tia Cleusa e Tia Cleonice; Vó Nenzinha; Tio Ademir e família; Tia Cida e Thiago, minha família em São Paulo... enfim, a todos os meus familiares que estiveram, direta e indiretamente, ao meu lado durante esta caminhada.

À amiga e companheira de apartamento, Acácia pela acolhida em São Paulo;

Ao professor Dr. José Soares, pela confiança, amizade e, sobretudo, pela orientação neste trabalho;

Ao Dr. César Alejandro Rosales, Pancho, por todos os conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho, conhecimentos estes que engrandeceram a minha vida profissional;

À Drª. Lara Borges, por toda a atenção e pela gentileza de compartilhar seus conhecimentos comigo;

Aos professores, Dr. Paulo Brandão e Dr. Rodrigo, por elucidarem as constantes dúvidas que surgiram no decorrer do meu experimento;

Aos professores Dr. Silvio Arruda e Drª. Sônia, pela acolhida no laboratório;

Aos professores e funcionários do VPS, pela assessoria, apoio, e ensinamentos, imprescindíveis na minha formação profissional;

Às amigas Amane e Flávia Morato por todo apoio durante esta jornada e pelo exemplo de dedicação à pesquisa;

Aos amigos e amigas pós-graduandos e estagiários dos Laboratórios de Zoonoses Bacterianas, LABMAS e Sanidade Suína: Marianna Matrone, Pilar, Wilsilene, Ricardo, Carlos, Cássia, Flávia Carolina, Iracema, Vanessa, Tania e Sergio, pelo apoio, amizade e descontração, durante todos os momentos, dentro e fora do nosso ambiente de trabalho;

Ao mestrando José Henrique Grisi, pela ajuda nas análises estatísticas e todos os pós-graduandos do LEB;

À Zenaide e à Gisele, pelos ensinamentos e pela presteza que sempre demonstraram ao ajudar a todos os que passam pelo LZB;

À Sheila, do LABMAS, pela ajuda dispensada quando da utilização desse laboratório e na elucidação de várias dúvidas;

Aos funcionários Sandra, Bispo e Alexandre (Fininho), por toda a atenção e disposição em ajudar-me;

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

Ao ombro amigo e aconchegante de Carol da copa e Jucélia do LEB;

Aos funcionários da Pós-Graduação pelos esclarecimentos;

Às bibliotecárias da FMVZ/USP, pela atenção desmedida;

Ao MAPA e ao CNPq pelo incentivo financeiro.

"Nossa vida muda a cada segundo, mas é a soma de todos os momentos que faz com que você seja tão diferente e tenha uma história que só você pode contar, isso porque a vida não é feita de traços retos, perfeitos e comuns. A vida é feita do seu talento de transformar até os mais simples acontecimentos em lembranças inesquecíveis."

Autor Desconhecido

"Há pessoas que estão sempre atribuindo às circunstâncias aquilo que são. Não acredito nas circunstâncias. As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, se não as encontram, as criam."

George Bernard Shaw

RESUMO

ROCHA, V. C. M. **Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de *Spoligotyping,* MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas.** [Discrimination of *Mycobacterium bovis* isolates by Spoligotyping, MIRU, and ETR and their epidemiologic applications]. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O *Mycobacterium bovis* é o agente causador da tuberculose em bovinos, zoonose que produz prejuízos para a produção de carne e leite em muitos países. Para apoiar estudos epidemiológicos no âmbito dos programas de controle, recentemente surgiram vários métodos de discriminação molecular de isolados de *M. bovis*. Os mais utilizados são o *Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU) e *Exact Tandem Repeat* (ETR), que apresentam diferentes poderes de discriminação. No presente estudo calculou-se a diversidade alélica para cada locus de MIRU e de ETR e o índice discriminatório de Hunter-Gaston (HGI) para o *Spoligotyping*, 10 MIRU e 3 ETR em 116 amostras de *M. bovis* isoladas de bovinos. Além disso, verificou-se se a capacidade de detectar agrupamentos espaciais de focos aumenta na medida em que é aumentado o poder discriminatório das análises moleculares. Comparou-se a utilização dessas três técnicas moleculares em análises espaciais para verificação de agrupamentos de focos da doença. A análise da diversidade alélica indicou que os MIRU 16, 26 e 27 e os ETR A, B e C foram os que apresentaram maior diversidade dentre os ensaiados. O HGI para cada uma das técnicas foi de: *Spoligotyping* = 0,738381; MIRU = 0,829835 e ETR = 0,825337. A associação desses métodos aumentou o poder discriminatório: *Spoligotyping* + MIRU = 0,930585; *Spoligotyping* + ETR = 0,931034; MIRU + ETR = 0,953373. O maior poder discriminatório foi alcançado quando as três técnicas foram associadas (HGI = 0,98051). Considerando as análises realizadas no presente estudo, o método inicial deveria ser o *Spoligotyping*, por diferenciar o *M. bovis* dos outros integrantes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Como as associações do MIRU e do ETR com o *Spoligotyping* resultaram em HGI praticamente idênticos, depois do *Spoligotyping*, o método ETR parece ser a melhor escolha, pois é mais rápido e econômico do que o MIRU. Finalmente, o MIRU deve ser o último método a ser realizado. Assim, a escolha do método depende do poder discriminatório necessário para o objetivo em questão. Embora a capacidade de detectar agrupamentos espaciais de focos não tenha sido aumentada na medida em que cresceu o poder discriminatório das análises moleculares, a premissa continua válida.

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

ABSTRACT

ROCHA, V. C. M. **Discrimination of *Mycobacterium bovis* isolates by Spoligotyping, MIRU, and ETR and their epidemiologic applications** [Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de *Spoligotyping,* MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas]. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Mycobacterium bovis is the causative organism of bovine tuberculosis, has zoonotic character and leads economic losses in livestock production in a lot of countries. To support the epidemiological researches on the disease control programs several molecular methods has been used to detect *M. bovis* strains. Among them, *Spoligotyping*, Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) and Exact Tandem Repeat (ETR) are the molecular analyses that present different powers of *Mycobacterium bovis* discrimination. In this study, allelic diversity of MIRU and ETR locus and Hunter-Gaston discriminatory index (HGI) were calculated for *Spoligotyping*, 10 MIRU and 3 ETR of 116 isolates of *M. bovis* from Brazilian bovines. The use of those three molecular techniques was compared in space analyses for verification of groupings of focuses of the disease. Besides, it was verified if the capacity to cluster of focuses increases in the measure in that the discriminatory power of the molecular analyses is increased. The analysis of the allelic diversity indicated that MIRU 16, 26, 27 and ETR A, B, C presented larger diversity among the rehearsed. The HGI for each individual technique was: *Spoligotyping* = 0.738381; ETR = 0.825337 and MIRU = 0.829835. The associations of these methods increased the discriminatory power: *Spoligotyping* + MIRU = 0.930585; *Spoligotyping* + ETR = 0.931034; MIRU + ETR = 0.953373. The greater discriminatory power was verified when the three techniques were associated (HGI = 0,98051). Considering the analyses performed, the initial method for differentiating *M. bovis* from the other species of the *M. tuberculosis* complex should be *Spoligotyping*. The association of MIRU and ETR with *Spoligotyping* resulted in HGI almost identical, after *Spoligotyping*, the ETR technique showed to be the best choice, due the shorter time to process and economic benefits when compared to MIRU. Finally, MIRU is the last method to be performed. Thus, the choice among the techniques depends on the discriminatory power necessary for the task. Although the capacity to detect clusters of focuses has not been increased in the measure in that it increased the discriminatory power of the molecular analyses, the premise continues valid.

Keywords: *Mycobacterium bovis*. *Spoligotyping*. MIRU. ETR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resultado da eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação realizada com os *primers* Tb11 e Tb12, caracterizando a amostra como pertencente ao gênero Mycobacterium-São Paulo-2009 55

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose mostrando fragmentos de 240, 120 e 85bp gerados pela digestão do amplificado de 439bp, específico do gênero Mycobacterium, pela enzima de restrição *Bst*EII-São Paulo-2009 56

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose mostrando fragmentos de 150, 130 e 70bp gerados pela digestão do amplificado de 439bp, específico do gênero Mycobacterium, pela enzima de restrição *Hae*III-São Paulo-2009 57

Figura 4 – Resultado do *Spoligotyping* com exemplos dos espoligotipos SB0120, SB0295, SB0881 e dos controles *M. bovis*-BCG e *M. tuberculosis*-H37Rv-São Paulo-2009 58

Figura 5 – Resultado do *Spoligotyping* com exemplos dos espoligotipos SB0121, SB0881, SB0295, SB0120 e SB0140-São Paulo-2009 59

Figura 6 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 2 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 60

Figura 7 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 4 das amostras 1 a 9 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 60

Figura 8 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 10 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 61

Figura 9 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 16 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 61

Figura 10 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 23 das amostras 1 a 7 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 62

Figura 11 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 26 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 62

Figura 12 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 27 das amostras 1 a 10 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 63

Figura 13 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 31 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 63

Figura 14 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 39 das amostras 1 a 10 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 64

Figura 15 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 40 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 64

Figura 16 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR A das amostras 1 a 9 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 65

Figura 17 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR B das amostras 1 a 9 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 65

Figura 18 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR C das amostras 1 a 8 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009 66

Figura 19 – Localizações espaciais de 66 focos de isolados de *M. bovis* do estado de São Paulo, discriminados pela técnica de *Spoligotyping*-São Paulo-2009 74

Figura 20 – Localizações espaciais de 66 focos de isolados de *M. bovis* do estado de São Paulo, discriminados pela técnica de MIRU-São Paulo 2009 75

Figura 21 – Localizações espaciais de 66 focos de isolados de *M. bovis* do estado de São Paulo, discriminados pela técnica de ETR-São Paulo 2009 76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultado da análise espacial para o Espoligotipo SB0295-São Paulo-2009 77

Gráfico 2 – Resultado da análise espacial para o padrão 16 de MIRU-São Paulo-2009 78

Gráfico 3 – Resultado da análise espacial para o padrão 4 de ETR-São Paulo – 2009 79

Gráfico 4 – Resultado da análise espacial para o padrão a6 da combinação do *Spoligotyping* S0121 com os MIRU e os ETR-São Paulo-2009 80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Volumes em µL dos reagentes utilizados na técnica PCR-PRA, para a amplificação do fragmento de 439bp, responsável pela codificação da proteína de choque térmico hsp65, que caracteriza o isolado como pertencente ao gênero Mycobacterium-São Paulo-2009 45

Quadro 2 – Volumes em µL dos reagentes utilizados para a amplificação da Região DR das micobactérias, na técnica de *Spoligotyping*-São Paulo-2009 47

Quadro 3 – Volumes em µL dos reagentes utilizados para a amplificação dos loci de MIRU e ETR-São Paulo-2009 48

Quadro 4 – MIRU e ETR estudados, segundo os pesos moleculares dos loci, os primers utilizados na amplificação e a temperatura de anelamento-São Paulo-2009 49

Quadro 5 – Perfil dos espoligotipos estudados segundo padrão internacional www.mbovis.org-São Paulo-2009 59

Quadro 6 – Grau de polimorfismo de cada locus estudado-São Paulo-2009 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de alelos segundo o MIRU e o peso molecular (pares de bases) do amplificado 50

Tabela 2 – Exemplificação de como obter o número de alelos de um determinado ETR-São Paulo-2009 51

Tabela 3 – Frequência de espoligotipos das 116 amostras de *M. bovis* estudadas-São Paulo-2009 58

Tabela 4 – Amostras, segundo espoligotipos, número de alelos em cada locus de MRU e ETR-São Paulo-2009 67

Tabela 5 – Número de ocorrências dos alelos dos MIRU e ETR e a diversidade alélica de cada locus-São Paulo-2009 69

Tabela 6 – Poder discriminatório do *Spoligotyping*, do MIRU e do ETR, utilizados isoladamente e em combinações-São Paulo-2009 70

Tabela 7 – Amostras, segundo espoligotipos, notações adotadas para as análises e localizações geográficas-São Paulo-2009 71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 27

2 REVISÃO DE LITERATURA 29

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO 29

2.2 DIAGNÓSTICO 30

2.2.1 Diagnóstico Direto 31

2.2.1.1 Isolamento e Identificação 31

2.2.1.2 Técnicas moleculares utilizadas para genotipagem de isolados do complexo *M. tuberculosis* 32

2.2.1.2.1 *Spoligotyping* 34

2.2.1.2.2 *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) 36

2.2.1.2.3 *Exact Tandem Repeat* (ETR) 39

3 OBJETIVOS 41

4 MATERIAL E MÉTODOS 43

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 43

4.2 AMOSTRAS 43

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO 44

4.4 PCR-PRA (*Polymerase Chain Reaction - PCR Restriction Analysis*) 44

4.5 SPOLIGOTYPING 46

4.6 MIRU E ETR 48

4.7 CÁLCULO DA DIVERSIDADE ALÉLICA 51

4.8 CÁLCULO DO ÍNDICE HUNTER-GASTON DE DISCRIMINAÇÃO (HGI) 51

4.9 ANÁLISE ESPACIAL PARA VERIFICAÇÃO DE EXISTÊNCIA DE AGRUPAMENTOS 52

5 RESULTADOS 55

5.1 PCR-PRA 55

5.2 SPOLIGOTYPING 58

5.3 MIRU E ETR 60

5.4 DIVERSIDADE ALÉLICA 69

5.5 GRAU DE DISCRIMINAÇÃO DAS TÉCNICAS 70

5.6 ANÁLISE ESPACIAL 71

6 DISCUSSÃO 81

7 **CONCLUSÕES** 85
REFERÊNCIAS 87

1 INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium bovis* é o agente causador da tuberculose em bovinos. Além dos bovinos, esse patógeno tem uma gama enorme de hospedeiros, acometendo tanto os animais domésticos quanto silvestres e o homem. A infecção causada por este agente é altamente prevalente em animais de alguns países em desenvolvimento (COSIVI et al., 1998), gerando danos às cadeias de produção de carne e leite.

Informação epidemiológica de boa qualidade aumenta a eficiência dos programas de controle da tuberculose bovina. Com as novas ferramentas da epidemiologia molecular, as possibilidades de encontrar respostas para questões como a importância da transmissão entre bovinos e seus fatores de riscos, assim como o papel dos animais silvestres como reservatórios, estão crescendo (HILTY et al., 2005). A associação de métodos moleculares, principalmente aqueles baseados em reações da PCR, tais como o PCR-PRA (*Polymerase Chain Reaction - PCR Restriction Analysis*) (TELENTI et al., 1993), o *Spoligotyping* (KAMERBEEK et al., 1997), o MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unitis*) (SUPPLY et al., 1997, 2000) e o ETR (*Exact Tandem Repeat*) (GOYAL et al., 1994; FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998) têm proporcionado grande impulso nos estudos da epidemiologia molecular do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Estes métodos auxiliam na identificação e discriminação das espécies, possibilitando a realização de estudos epidemiológicos.

A técnica de PCR-PRA consiste na habilidade de enzimas de restrição de cortar o DNA em determinados fragmentos, com determinada seqüência de bases. O produto destes cortes no DNA produz fragmentos de diferentes tamanhos, que são separados de acordo com o seu peso molecular, por eletroforese em agar gel, possibilitando por meio de chaves de classificação, a diferenciação de espécies e subespécies de micobactérias (TELENTI et al., 1993).

O *Spoligotyping* é baseado na amplificação enzimática do *locus* DR (*Direct Repeat*) do complexo *M. tuberculosis*, detectando a presença ou ausência de espaçadores presentes neste *locus*. Esta detecção é feita pela hibridização destes espaçadores a uma membrana, usando um minibloter (KAMERBEEK et al., 1997).

Supply et al. (1997, 2000) identificaram vários loci de VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) presentes no genoma dos membros do complexo *M. tuberculosis*, que denominaram de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unitis* (MIRU). Os MIRU são

elementos do DNA de normalmente 40-100bp, encontrados como repetições em tandem e dispersos em regiões intergênicas dos genomas. Também foram identificados outros loci que continham repetições em tandem de seqüências de DNA idênticas, denominadas *Exact Tandem Repeat* (ETR) (GOYAL et al., 1994; FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998). A tipificação pelo MIRU e pelo ETR detecta, através da verificação do tamanho dos produtos amplificados, em gel de agarose, o número de repetições dos loci.

A melhor compreensão da epidemiologia das infecções pelo *M. bovis* nos bovinos contribuirá para alcançar o melhor controle ou erradicação da doença. A habilidade de identificar e diferenciar as espécies e traçar o ponto de origem da infecção pode facilitar esta tarefa. Para este propósito, é necessário ter uma correlação precisa entre tipificação e dados epidemiológicos (ROMANO et al., 1996).

O presente estudo tem como objetivo: verificar como os diferentes espoligotipos de *M. bovis* comportam-se frente às técnicas de MIRU e de ETR, calcular a diversidade genética para cada locus dos MIRU e dos ETR, calcular o poder discriminatório destas técnicas, analisadas individualmente ou em associação e comparar as técnicas de *Spoligotyping*, MIRU e ETR, individualmente e em associação, para aplicações nas análises espaciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales*, família *Micobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*, com mais de 100 espécies conhecidas, tratando-se de bacilos imóveis, não esporulados, aeróbios, não capsulados e não flagelados, medindo de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento e álcool-ácido resistentes, ou seja, quando corados a quente pela fucsina, resistem à descoloração com álcool-ácido. As espécies de importância epidemiológica para o homem estão inseridas no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que inclui o *M. tuberculosis,* o *M. bovis*, o *M. microti* (patogênico apenas para ratazana – *Microtis agrestis*), o *M. africanum* (ainda não isolada no Brasil), o *M. canettii*, não patogênico para o homem (BIER, 1978; CORNER, 1994; BROSCH et al., 2002) e o *M. pinnipedii* isolada em focas e leões marinhos (COUSINS et al., 2003).

Geneticamente, todos os membros do complexo *M. tuberculosis* são extremamente similares, tendo 99,9% de similaridade à nível de nucleotídeo e idênticas seqüências de 16S rRNA (BROSCH et al., 2002). No entanto, estas espécies podem ser diferenciadas com base nos seus hospedeiros, na virulência e nas características fisiológicas. Por exemplo, o *M. bovis* possui a mais ampla gama de hospedeiros do complexo, causando doença em diferentes espécies de animais, tais como, bovinos, caprinos, animais marinhos, cervídeos, assim como no homem (O'REILLY; DABORN, 1995). A conservação da seqüência de 16S rRNA, entre todos os membros do complexo de *M. tuberculosis*, tem uma conseqüência prática importante: todas as técnicas desenvolvidas podem ser adaptadas às outras (HADAD et al., 2004).

O DNA genômico do *Mycobacterium tuberculosis* possui 4.411.529bp, contendo aproximadamente 4.000 genes e com grande quantidade de guanidina+citosina (65,6%). Também é rico em regiões repetitivas, particularmente, seqüências de inserções, de famílias multigênicas e de genes de expressão basal (housekeeping genes), que são os responsáveis pela manutenção do metabolismo celular (COLE et al., 1998).

O sequenciamento do DNA genômico da cepa AF2122/97 de *M. bovis* identificou que esta amostra possui 4.345.492bp em seu genoma, organizado em um único cromossoma circular com um conteúdo de 65,63% G+C, em média. Contêm 3.952 genes codificadores de

proteínas, incluindo um profago e 42 elementos IS. A amostra AF2122/97 é uma amostra britânica altamente virulenta, isolada em 1997 de uma vaca doente, com lesões caseosas no pulmão e nos linfonodos broncomediastinais. De forma impressionante, o genoma do *M. bovis* é >99,95% geneticamente idêntico ao *M. tuberculosis*, mostrando colinearidade e nenhuma evidência de grandes translocações, duplicações ou inversões. Os componentes da parede celular e as proteínas que são secretadas demonstram a suas maiores variações, indicando seus papéis potenciais nas interações com os hospedeiros ou na evasão imunológica (GARNIER et al., 2003).

Apesar de ser notável a falta de mutações nas micobactérias dentro dos seus extensos genomas, existem loci que mostram significativa diversidade entre as espécies (GORDON et al., 2001). Para o *M. bovis*, a região de repetição direta (*Direct Repeat* – DR) é a melhor caracterização de variação de locus e forma a base da técnica de tipificação do oligo-espaçador (*Spoligotyping*) (KAMERBEEK et al., 1997). Outros loci também podem ser úteis na tipificação de amostras de *M. bovis*, incluindo os genes codificadores de proteínas da família PE e PPE (COLE et al., 1998), ou os MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) (SUPPLY et al., 1997, 2000).

2.2 DIAGNÓSTICO

O método de diagnóstico *in vivo* é o teste tuberculínico padronizado apenas para bovinos e bubalinos, é baseado na reação intradérmica do PPD (derivado protéico purificado), um extrato de antígenos do *M. bovis*, uma vez que o diagnóstico clínico da doença é muito difícil, e os sintomas podem não estar presentes em infecções recentes (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973; HAAGSMA, 1995). O teste é de fácil manuseio e de baixo custo, mas de baixa especificidade devido ao *M. bovis* possuir alguns antígenos em comum com outras micobactérias, tais como o *Mycobacterium avium*, dos quais os animais estão freqüentemente expostos (LEPPER; CORNER, 1983). Na tentativa de resolver este problema, recomenda-se a utilização dos testes intradérmicos comparativos nas quais as reações ao PPD, preparado com ambas as micobactérias (*M. bovis* e *M. avium*), são comparadas. No entanto, os testes comparativos não eliminam todas as reações inespecíficas (COLLINS et al., 1994).

Para o exame *post mortem*, estudos bacteriológicos e histopatológicos das lesões macroscópicas permitem controlar o diagnóstico realizado a campo. No entanto, uma grande desvantagem é que agentes outros, que não o *M. bovis*, podem induzir a formação de lesões semelhantes às da tuberculose bovina (DE LISLE et al., 1993). Uma outra desvantagem no diagnóstico da tuberculose bovina encontra-se na detecção microscópica dos organismos álcool-ácido resistentes, possuindo baixa sensibilidade e detectando somente bactérias em concentrações iguais ou superiores a 10.000/mL. Apesar de algumas lesões possuírem um número considerável de *M. bovis*, tecidos com poucas micobactérias são comuns. Isto ocorre particularmente nos bovinos, onde em menos de 50% dos cultivos positivos consegue-se observar organismos álcool-ácido resistentes (BARKSDALE; KIM, 1977).

O diagnóstico definitivo da doença baseia-se no isolamento e na identificação do agente etiológico (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995).

2.2.1 Diagnóstico Direto

O diagnóstico direto baseia-se na detecção do agente etiológico na amostra em estudo, por meio do seu isolamento ou da identificação do seu DNA pelos métodos de biologia molecular.

2.2.1.1 Isolamento e Identificação

Para a detecção do *M. bovis* nos fragmentos dos tecidos, utiliza-se a bacteriologia clássica, que é baseada na descontaminação da amostra, seguida de semeadura em meios de cultura sólidos (Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Leslie) e posterior incubação a 37ºC por 60 a 90 dias (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973). As micobactérias possuem uma parede celular constituída de ácidos micólicos de cadeia longa, com 60 a 90 átomos de carbono, conferindo provavelmente a relativa resistência aos produtos desinfetantes e

descontaminantes e possibilitando o processo de descontaminação anterior ao cultivo (BIER, 1978).

Para o seu cultivo, há a necessidade de organismos viáveis e este pode ser um problema quando as amostras são inadequadamente armazenadas (WARDS et al., 1995).

Após o isolamento, realiza-se a identificação da micobactéria. Para isto, a bacteriologia clássica utiliza como parâmetros a velocidade de crescimento, os aspectos morfológicos, a produção de pigmento na presença e ausência de luz, e a resistência a drogas, o que consome aproximadamente quatro semanas. Testes bioquímicos também podem ser realizados, no entanto, estes testes requerem culturas puras dos isolados micobacterianos e podem levar várias semanas para executá-las após ter sido realizado o cultivo. (VESTAL, 1975; KANTOR, 1979).

O diagnóstico das infecções pelas micobactérias continua sendo um problema, devido ao longo tempo exigido pelos métodos clássicos, surgindo a necessidade de testes rápidos e confiáveis para esta finalidade. Métodos moleculares têm sido investigados tais como o PCR-PRA (TELENTI et al., 1993), o *Spoligotyping* (KAMERBEEK et al., 1997) e o MIRU-VNTR (SUPPLY et al., 1997, 2000).

2.2.1.2 Técnicas moleculares utilizadas para genotipagem de isolados do complexo *M. tuberculosis*

O advento da engenharia genética tem fornecido estratégias alternativas baseadas no DNA, com grande potencial para elucidar os problemas relacionados à identificação das micobactérias. O desenvolvimento da eletroforese em gel de agarose para a separação dos fragmentos de DNA em diferentes tamanhos, seguido pela disponibilidade de enzimas de restrições levou ao desenvolvimento de análises destes fragmentos do DNA bacteriano. Estas enzimas de restrições são chamadas de endonucleases e clivam o DNA em sítios definidos, gerando fragmentos que caracterizam a espécie do qual o DNA foi isolado (MARSHALL et al., 1981). Neste princípio encontra-se a técnica descrita por Telenti et al., em 1993, denominada PCR-PRA (*Polymerase Chain Reaction - PCR Restriction Analysis*). Este método baseia-se na variação da seqüência de nucleotídeos do locus hsp65, em diferentes espécies de micobactérias, sugerindo um método de identificação através da análise do polimorfismo, determinado pelos fragmentos de digestão do gene em questão, envolvendo a

amplificação de um fragmento de 439 pares de base, posteriormente, digeridos pelas enzimas *Bst*EII e *Hae*III, possibilitando por meio de chaves de classificação a diferenciação de espécies.

Como a amplificação do DNA tem a habilidade de detectar uma única célula, esta técnica torna-se mais sensível, do que os métodos tradicionais de cultivo. O baixo número de células, que podem ser destruídas pelos processos de descontaminação usados pelos métodos de cultivos tradicionais, e células que podem não estar viáveis podem ser detectadas usando a técnica de amplificação (COUSINS et al., 1991).

O ideal seria que as técnicas de tipificação micobacteriana para a aplicação de rotina em números grandes de amostras fossem de fácil utilização, rápidas, com baixos custos, que não necessitassem de equipamentos e pessoal especializados, com fácil nomenclatura e com boa reprodutibilidade entre os laboratórios e suficientemente discriminatórias (RORING et al., 2002). O advento das técnicas de tipificação molecular concedeu grandes melhorias ao conhecimento epidemiológico nos estudos dos surtos da tuberculose (PERUMAALLA et al., 1999).

Nos últimos anos, a epidemiologia molecular, ou seja, a integração de procedimentos de tipificação de espécies com a busca epidemiológica convencional, tem produzido dados mais específicos com os quais informam, influenciam e monitoram as estratégias de controle e vigilância da tuberculose (VAN SOOLINGEN et al., 1999). Também possibilita a identificação de surtos que permanecem não detectáveis pela vigilância epidemiológica tradicional e pode assim ser utilizada como uma base para esta. Além disso, pode fornecer esclarecimentos na dinâmica de disseminação internacional do agente, pela comparação dos isolados nas diferentes áreas geográficas e permite analisar as mudanças evolutivas das populações dos patógenos (VAN SOOLINGEN et al., 1999).

Além do mais, a aplicação da genotipagem tem contribuído no esclarecimento da estrutura clonal do complexo *M. tuberculosis*, que se constitui de distintas linhagens filogenéticas caracterizadas pelas diferenças em suas distribuições geográficas, imunogenicidades, virulência e associações com tuberculoses multidroga-resistentes (VAN SOOLINGEN et al., 1995; SUPPLY et al., 2003; GAGNEUX; SMALL, 2007). Análises quantitativas dos dados da genotipagem também podem ajudar na identificação de espécies emergentes (TANAKA; FRANCIS, 2006). De uma perspectiva da pesquisa, a identificação precisa das espécies e o estudo de clones específicos espalhados mundialmente podem contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico, a profilaxia e o tratamento da tuberculose humana (GAGNEUX; SMALL, 2007).

Existe uma variedade considerável de técnicas disponíveis para tipagem dos membros do complexo *M. tuberculosis.* Van Embden et al. publicaram um protocolo padrão, no ano de 1993, aceito internacionalmente, para tipagem de isolados de *M. tuberculosis*, avaliando a presença da seqüência de inserção IS*6110* pela detecção do polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição ("*Restriction Fragment Polymorphism*" – RFLP). Esta técnica é considerada padrão ouro (*gold standard*) entre os métodos de tipagem (VAN EMBDEN et al., 1993). No entanto, um número de limitações foi demonstrado, dentre elas, seu poder discriminatório para isolados com poucas cópias de IS*6110* é baixo e não é suficientemente precisa para identificar possíveis linhagens genéticas, consequentemente tipagem secundária usando um outro marcador genético é frequentemente requerido (KAMERBEEK, 1997; KREMER et al., 2005a). Além de ser uma metodologia demorada e trabalhosa, a comparação intra ou inter-laboratorial de perfis é uma tarefa difícil que requer a entrada e a perícia intensiva dos investigadores (KAMERBEEK, 1997; KREMER et al., 2005a). Assim, para melhorar a comparação de perfis de RFLP, softwares especializados são necessários (SALAMON et al., 1998). Por estas razões, a técnica de RFLP-IS*6110* continua de difícil aplicação e metodologias alternativas de genotipagem rápidas, simples, e com custo mais baixo vem sendo requeridas.

2.2.1.2.1 *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 IS*6110* (KAMERBEEK et al., 1997).

O elemento DR foi identificado por Hermans et al. em 1991, quando caracterizaram a inserção do elemento IS*986* de *M. bovis*-BCG e o DNA cromossomal paralelo a este elemento. Cada região DR corresponde à repetição regular de 2 tipos de pequenas seqüências: que são todas idênticas, chamadas de seqüências DR e sequências que são todas diferentes, chamadas de espaçadores. Entre as seqüências DRs estão localizadas as seqüências

espaçadoras não repetitivas que podem conter de 34 a 41 pb (HERMANS et al., 1991). A associação de um espaçador e uma seqüência 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 seqüências 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; ZUMARRAGA, 1999; SAKAMOTO, 2001; 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 ausente, 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).

Uma das vantagens da técnica é a rapidez, o custo baixo e a tipificação 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; ZUMARRAGA, 1999; FILLIOL et al., 2000; SAKAMOTO, 2001; RORING et al., 2002).

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* é uma técnica nova, sofisticada, mas não apresenta grandes dificuldades na sua realização. 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.

2.2.1.2.2 *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR)

Seqüências repetidas em tandem estão dispersas em inúmeras cópias nos genomas dos eucariotos (COX; MIRKIN, 1997). Os loci com pequenas seqüências repetidas (SSR) de 1-13bp são normalmente citadas como microsatélites, e aqueles com seqüências repetidas de 10-100bp como minisatélites (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 transcripção 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 (EPPLEN et al., 1997; JEFFREYS et al., 1994).

O polimorfismo nos loci do tipo repetição em tandem pode ocorrer tanto como uma mudança na seqüência dos nucleotídeos, como da variação no número de unidades repetidas, consequentemente ambas criando uma variação alélica. A tipificação pelo VNTR é baseada no polimorfismo dos números destas seqüências 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 microsatélites com SSR (pequenas seqüências 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 flanqueadoras 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 seqüências 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 Toll*), 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, seqüência nucleotídica e organização. As seqüências do tipo I contêm aproximadamente 77pb enquanto as seqüências dos tipos II e III são caracterizadas por um intervalo (*gap*) de 24 e 15pb nas extremidades 3´ e 5´ das seqüências do tipo I, respectivamente. Seqüências 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 seqüência de bases que pode codificar uma proteína. Estes ORF possuem os códons de terminação e de iniciação dos seus flanqueadores genéticos (SUPPLY et al., 1997). Estes flanqueadores estão envolvidos em diversos mecanismos metabólicos e regulatórios, incluindo a biosíntese ou degradação dos lipídeos, dos ácidos nucléicos 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 flanqueadores dos MIRU (SUPPLY et al., 2000).

A tipificação 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-IS*6110*, a tipificação 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 tipificação pelo MIRU-VNTR pode ser amplamente acessível para pesquisas em laboratórios de saúde pública (MAZARS et al., 2001; BARNES et al., 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.

2.2.1.2.3 *Exact Tandem Repeat* (ETR)

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 sequência 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 tipificação pelo RFLP-IS*6110*, sobretudo com aumento do seu poder discriminatório.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos :

- Verificar como os diferentes espoligotipos de *M. bovis* comportam-se frente aos MIRU e aos ETR.
- Calcular a diversidade alélica para cada locus dos MIRU e dos ETR.
- Calcular o poder discriminatório destas técnicas, analisadas individualmente ou em associação.
- Comparar as técnicas de *Spoligotyping*, MIRU e ETR para aplicações nas análises espaciais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram analisados 116 isolados de *M. bovis,* provenientes de focos de tuberculose bovina do Estado de São Paulo, 77 deles georeferenciados. Essas amostras foram inicialmente submetidas à técnica PCR-PRA (TELENTI et al., 1993) e subsequentemente aos métodos *Spoligotyping* (KAMERBEEK et al., 1997), MIRU (SUPPLY et al., 1997, 2000) e ETR (GOYAL et al., 1994; FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998). Os resultados obtidos foram analisados através do Índice Hunter-Gaston de Discriminação (HUNTER; GASTON, 1988) e tratados para verificação da existência de agrupamentos espaciais de focos (BAILEY; GATRELL, 1995). Além disso, também foi calculada a diversidade genética para cada locus (SELANDER et al., 1986) pesquisados nas técnicas de MIRU e ETR, com o intuito de determinar os loci mais polimórficos.

4.2 AMOSTRAS

Os isolados utilizados no presente projeto foram selecionados dentre aqueles obtidos no âmbito do projeto "Abatedouros como instrumento de rastreabilidade de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo. Mapeamento e Epidemiologia Molecular" (RODRIGUEZ et al., 2004).

4.3 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 foi incubada a 80°C por 30 minutos para a inativação dos bacilos (BREMER-MELHIOR; DRUGEON, 1999). Em seguida, adicionou-se 50µL de lisozima na concentração de 10 mg/ml; a mistura foi 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%)], agitou-se e incubou 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 H_2O), pré-aquecido a 65°C. A mistura foi 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) foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, o DNA foi 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 foram 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.

4.4 PCR-PRA (*Polymerase Chain Reaction - PCR Restriction Analysis*)

Com base no método de identificação de micobactérias, descrito por Telenti et al., em 1993; foram feitas reações de 50µL: 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), dNTP's (2,5mM cada), 1,5mM de MgCl2, 10% de glicerol, 200mM, 20pmol de cada oligonucleotídeo iniciador Tb11 (5' – ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5' –

CTTGTCGAACCGCATACCCT), 1,25 Unidades de TAQ polymerase e 5,0µL do DNA em estudo (Quadro 1) e o DNA cromossomal da amostra controle de *M. bovis* AN5.

Empregou-se o seguinte ciclo de PCR:

- desnaturação inicial - 96°C, por 3 minutos;
- desnaturação do DNA - 94°C por 1 minuto, 45 vezes do ciclo de amplificação;
- anelamento - 60°C por 1minuto, 45 vezes do ciclo de amplificação;
- extensão - 72°C, por 1 minuto, 45 vezes do ciclo de amplificação;
- extensão final - 72°C, por 10 minutos.

O produto adquirido da PCR foi de 439bp, caracterizando como pertencente ao gênero Mycobacterium. Este produto foi submetido à digestão pelas enzimas de restrição *Bst*EII e *Hae*III.

Reagente	**Volume/amostra** Ml
Água ultra-pura	25,2
10 X PCR Buffer	5,0
Pool dNTPs 1,25 mM	8,0
Primer TB11 10 pmol/ml	2,5
Primer TB12 10 pmol/ml	2,5
MgCl2 50 mM	1,5
Taq DNA-Polimerase (1,25U)	0,3
DNA extraído	5,0
TOTAL	**50,0**

Quadro 1 – Volumes em µL dos reagentes utilizados na técnica PCR-PRA, para a amplificação do fragmento de 439bp, responsável pela codificação da proteína de choque térmico hsp65, que caracteriza o isolado como pertencente ao gênero Mycobacterium-São Paulo-2009

- Enzima de restrição *Bst*EII

O produto da amplificação (439bp) foi submetido à digestão pela enzima de restrição *BstE*II, com a seguinte reação: 20µL, com 0,5µL da enzima *BstE*II (5 unidades), 0,2µL de BSA (soro albumina bovina), 2,0µL de D 10x Buffer, 7,3µL de água ultra-pura e 10µL do produto de PCR, submetendo-as a 60°C por 60 minutos.

- Enzima de restrição *Hae*III

O produto da amplificação (439bp) também foi submetido à digestão pela enzima de restrição *Hae*III, seguindo a reação: 20µL, com 0,5µL da enzima *Hae*III (5 unidades), 2µL de

REact 2, 7,5µL de água ultra-pura e 10µL do produto de PCR, submetendo-as a 37°C, por 60 minutos.

- Eletroforeses

As eletroforeses foram feitas em cubas horizontais, usando-se tampão de corrida TBE (0,04M de Tris-acetato e 0,001M de EDTA, pH 8,0) e agarose nobre a 3,0% (p/v). Os géis de agarose, foram corados em solução de 5,0µg/mL de brometo de etídeo por 15 minutos, aproximadamente, e fotodocumentados pelo sistema de fotodocumentação automático AlphaImager®.

4.5 SPOLIGOTYPING

- 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 $MgCl_2$, 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 2) e os DNAs cromossomais de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 e *M. bovis* BCG.

O programa do PCR consistia 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.

Reagente	Volume/amostra µL
Água ultra-pura	31,25
Buffer	5,0
MgCl2 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**

Quadro 2 – Volumes em µL dos reagentes utilizados para a amplificação da Região DR das micobactérias, na técnica de *Spoligotyping*-São Paulo-2009

- Hibridização com a membrana e revelação

Após a amplificação, 20µL do produto de PCR foi adicionado em 180µL de 2 x SSPE/0,1%SDS (20 x SSPE: 0,2M de Na_2HPO_4, 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 seqüências 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 foi 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.

4.6 MIRU E ETR

Foram realizadas reações de 50µL, sendo 10µL de 5 x Green Taq Reaction Buffer 8,5 pH; 7,5 mM $MgCl_2$ (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 3) e o DNA da amostra de *M. bovis* AN5, como controle.

O ciclo do PCR empregado foi:

- 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 4 – 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.

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**

Quadro 3 – Volumes em µL dos reagentes utilizados para a amplificação dos loci de MIRU e ETR- São Paulo-2009

A revelação do produto amplificado foi feito 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 em solução de 5,0µg/mL de brometo de etídio por 5 a 10 minutros. A visualização e a documentação foi feita pelo sistema de fotodocumentação automático AlphaImager®.

MIRU	Tamanho da unidade de repetição (bp)	Sequências dos primers	Temperatura de anelamento em ºC
MIRU 2 MIRU 2-1	53	5' TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT 3' 5' TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT 3'	56
MIRU 4 MIRU 4-1	77	5' GCGCGAGAGCCCGAACTGC 3' 5' GCGCAGCAGAAACGTCAGC 3'	55
MIRU 10 MIRU 10-1	53	5' GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC 3' 5' GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT 3'	55
MIRU 16 MIRU 16-1	53	5' TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA 3' 5' CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC 3'	58
MIRU 23 MIRU 23-1	53	5' CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG 3' 5' AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC 3'	56
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
MIRU 31 MIRU 31-1	53	5' ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA 3' 5' GTGCCGACGTGGTCTTGAT 3'	51
MIRU 39 MIRU 39-1	53	5' CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC 3' 5' CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT 3'	55
MIRU 40 MIRU 40-1	54	5' GGGTTGCTGGATGACAACGTGT 3' 5' GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA 3'	53
ETR A ETR A-1	75	5' AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT 3' 5' CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT 3'	51
ETR B ETR B-1	57	5' ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT 3' 5' CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC 3	58
ETR C ETR C-1	58	5' CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT 3' 5' AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA 3'	53

Quadro 4 – MIRU e ETR estudados, segundo os pesos moleculares dos loci, os primers utilizados na amplificação e a temperatura de anelamento-São Paulo-2009

Para identificar o número de alelos de cada locus de MIRU utilizamos a tabela 1.

Tabela 1 – Número de alelos segundo o MIRU e o peso molecular (pares de bases) do amplificado

Allele	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23[1]	MIRU 23[2]	MIRU 24	MIRU 26[1]	MIRU 26[2]	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
0	402	175	482	565	437	558	150	395	461	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	608	200	447	512	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	661	253	501	563	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	714	306	555	614	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	767	359	609	665	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	820	412	663	716	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	873	465	717	767	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	926	518	771	818	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	979	571	825	869	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	1032	624	879	920	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	1085	677	933	971	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	1138	730	987	1022	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	1191	783	1041	1073	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	1244	836	1095	1124	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	1297	889	1149	1175	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	1350	942	1203	1226	1050	1293	1287	1335	1164

[1]with oligonucleotides used in Supply et al., 2000, *Mol. Microbiol.*, 36, 762-771 and described in Mazars et al 2001, *PNAS*, 98, 1901-1906 (see supplemental data on the PNAS Web site http://www.pnas.org)

Para identificação do número de alelos de cada locus de ETR seguiram-se os seguintes passos:

1- Deve-se inicialmente saber o padrão de cada repetição, ou seja, o número de nucleotídeos de cada ETR.

2- Deve-se saber o tamanho dos *primers*: senso e antisenso.

3- Deve-se conhecer a localização dos *primers*. Estes estão inseridos antes e depois das repetições e há uma distância entre o *primer* senso e o início das repetições e também entre o *primer* antisenso e o final das repetições (ou seja, a região que é amplificada, mas que não corresponde às repetições).

O tamanho dos primers e das regiões não repetidas não são variáveis entre as diferentes amostras, considerando cada um dos MIRU e dos ETR.

A tabela 2 contêm exemplos dos cálculos desenvolvidos neste trabalho para a obtenção do número de alelos de um determinado ETR:

Tabela 2 – Exemplificação de como obter o número de alelos de um determinado ETR-São Paulo-2009

	Tamanho da repetição (bp)	**Região não variável**	**Produto amplificado (exemplo)**	**Cálculo número de alelos**
ETR A	75bp	195bp	800bp	800 – 195 = 605 ÷ 75 = 8 alelos
ETR B	57bp	121bp	500bp	500 – 121 = 379 ÷ 57 = 6 alelos
ETR C	58bp	44bp	150bp	450 – 44 = 406 ÷ 58 = 7 alelos

4.7 CÁLCULO DA DIVERSIDADE ALÉLICA

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

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

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

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

4.8 CÁLCULO DO ÍNDICE HUNTER-GASTON DE DISCRIMINAÇÃO (HGI)

O cálculo do HGI das três técnicas (*Spoligotyping*, MIRU e ETR – isoladas e em associações) foi feito conforme preconizado por Hunter e Gaston (1988), segundo a fórmula

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

onde *n* é o número de isolados (amostras) em uma população, *s* é o número total de tipos descritos e n_j é o número de amostras pertencentes ao tipo *j*.

Uma avaliação de qual o método de tipificação é mais eficiente tem que ser baseada em um número de fatores: capacidade de tipificação, reprodutibilidade e discriminação. Destas características, a capacidade de tipificação e a reprodutibilidade são relativamente fáceis de quantificar e são freqüentemente expressas como percentagens simples. Assim, a capacidade de tipificação de um método é a porcentagem de distinguir as amostras bacterianas que podem ser identificadas como positivas e a reprodutibilidade é a porcentagem de amostras que tem o mesmo resultado em repetidos testes. O poder discriminatório de um método de tipificação é sua habilidade de distinção entre amostras não correlacionadas. Isto é determinado pelo o número de tipos definidos por um método e as freqüências relativas destes tipos.

Hunter e Gaston (1988) sugeriram o uso de um índice numérico de discriminação, baseado na probabilidade de 2 amostras, não correlacionadas de uma população teste, serem identificadas como pertencentes a diferentes grupos. Esta probabilidade é calculada pelo índice Hunter-Gatson de discriminação, que foi desenvolvido para a descrição de diversidades de espécies em um determinado habitat ecológico. Segundo Hunter e Gaston, um teste para estudos epidemiológicos é considerado eficiente quando possuir um índice de discriminação de pelo menos 90%.

4.9 ANÁLISE ESPACIAL PARA VERIFICAÇÃO DE EXISTÊNCIA DE AGRUPAMENTOS

Mapa temático da tuberculose bovina no Estado de São Paulo foi confeccionado com base na localização espacial (latitude e longitude) de 66 focos associada à discriminação molecular gerada pelas três técnicas em estudo (*Spoligotyping*, MIRU e ETR – isoladas e em associações), com o intuito de verificar a existência de agrupamentos espaciais (clusters) de genótipos. Os mapas foram gerados pelo programa ArcGIS 9.2 (ESRI INC, 1996) e as análises espaciais realizadas com o auxílio do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009) e pelo pacote “spacial” (VENABLES; RIPLEY, 2002).

No presente estudo, foi testada a hipótese de formação de agrupamento de focos de tuberculose bovina para três métodos de discriminação molecular de *M. bovis* isoladamente e em associação.

Uma das possibilidades para verificação de agrupamentos espaciais é a comparação da distribuição obtida com uma distribuição espacial aleatória. Entretanto, essa análise tem como pressuposição que o processo é isotrópico ou homogêneo e, no caso das doenças, sabe-se que a intensidade do aparecimento de casos varia com a densidade populacional, que normalmente não é homogênea. Assim, esse método tem aplicação limitada na investigação de agrupamentos de doenças (ELLIOT et al., 1992; BAILEY; GATRELL, 1995; CARPENTER, 2001).

Uma maneira alternativa para verificar a presença de agrupamento de doenças pode ser empregada quando da existência de um grupo ou processo controle que atue como substituto da população sob risco, representando suas variações espaciais (BAILEY; GATRELL, 1995). Nesse caso, supondo que n1 seja o número de casos observados na área de estudo R e n2 uma mostra aleatória de controles da mesma região R, tem-se que n=n1+n2 eventos. Se não há agrupamentos dos casos em relação aos controles, significa que os casos são uma amostra aleatória dos padrões somados de casos e controles. Assim, a hipótese a ser testada é a de identificação aleatória de casos e controles. Essa hipótese não faz pressuposições sob a forma dos processos envolvidos no aparecimento de casos e controles. Para testá-la pode-se utilizar a função K.

Sob a hipótese de identificação aleatória, os padrões de casos e controles, tomados individualmente, representam uma redução aleatória do processo espacial combinado. A função K, por definição, é invariante para reduções aleatórias, portanto K11(h)=K22(h)=K12(h).

Assim, um modo simples de identificar o afastamento diferente do padrão espacial aleatório é verificar a significância da diferença entre as estimativas dessas funções. Se casos são eventos do tipo 1 e controles eventos do tipo 2, pode-se utilizar um gráfico K11(h)-K22(h) como função de h (distância) para verificar o afastamento da pressuposição de identificação aleatória. Nesse caso, os picos representam agrupamento de casos. O limite superior e inferior dessa curva, utilizados para verificar a significância dos picos, são estimados a partir de valores de K11 e K22, calculados em repetidas simulações utilizando n1+n2 localizações fixas, porém identificando aleatoriamente n1 localidades como casos (BAILEY; GATRELL, 1995).

5 RESULTADOS

5.1 PCR-PRA

Todos os isolados foram submetidos à técnica de PCR-PRA e classificados como sendo do gênero Mycobacterium, e através do perfil adquirido na restrição das enzimas *Bst*EII e *Hae*III, foram classificados como pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* (INSTITUT PASTEUR, 2000). As figuras 1, 2 e 3 mostram os resultados para o PCR-PRA de um dos isolados analisados.

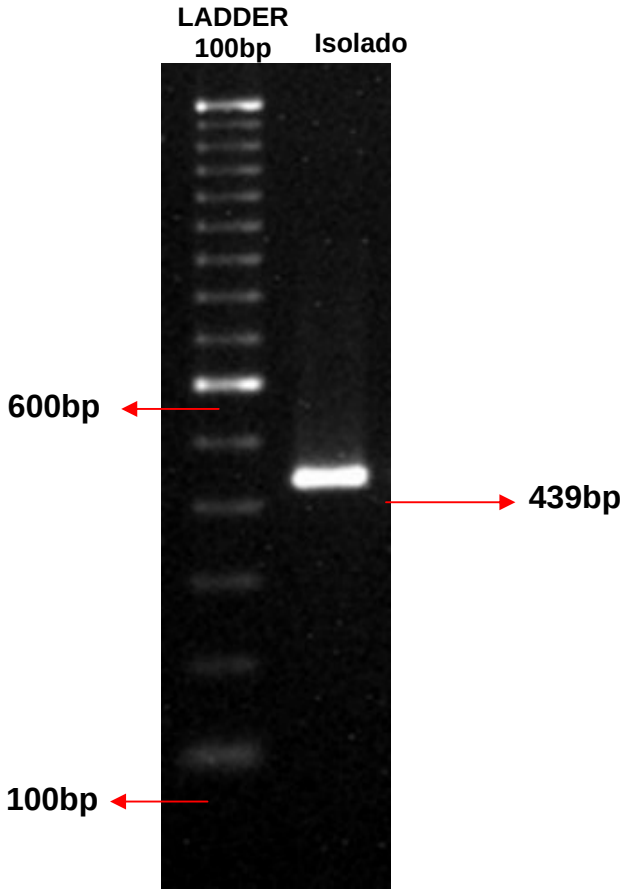

Figura 1 – Resultado da eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação realizada com os *primers* Tb11 e Tb12, caracterizando a amostra como pertencente ao gênero Mycobacterium-São Paulo-2009

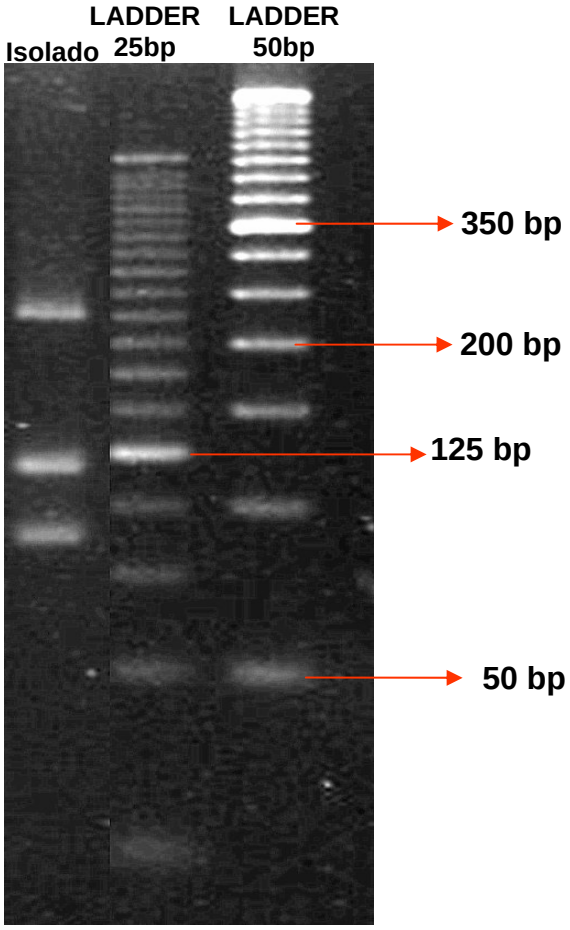

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose mostrando fragmentos de 240, 120 e 85bp gerados pela digestão do amplificado de 439bp, específico do gênero Mycobacterium, pela enzima de restrição *Bst*EII-São Paulo-2009

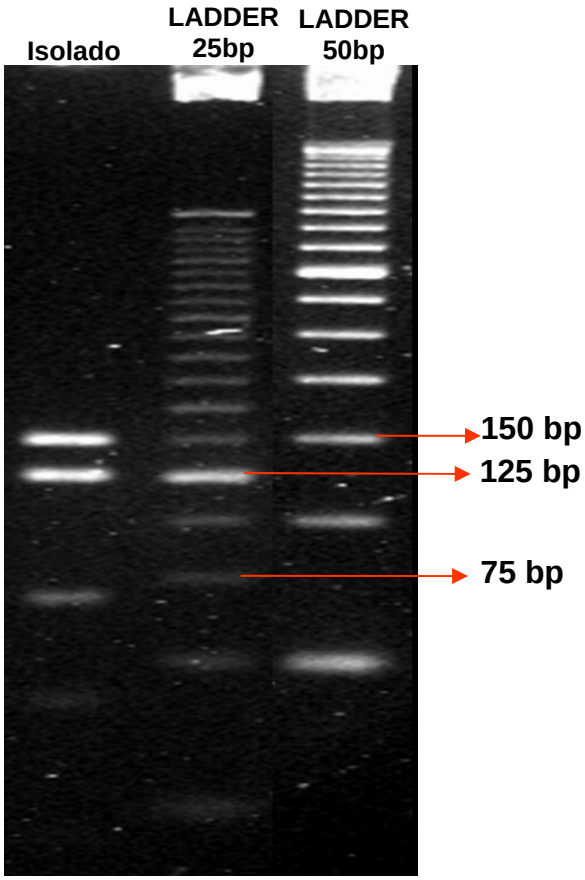

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose mostrando fragmentos de 150, 130 e 70bp gerados pela digestão do amplificado de 439bp, específico do gênero Mycobacterium, pela enzima de restrição *Hae*III-São Paulo-2009

5.2 SPOLIGOTYPING

Usando a tipificação pelo *Spoligotyping*, em 116 amostras de *M. bovis* estudadas, o espoligotipo majoritário foi o SB0295 (35,34%), seguido pelo SB0121 (32,76%), como observado na tabela 3.

Tabela 3 – Frequência de espoligotipos das 116 amostras de *M. bovis* estudadas-São Paulo-2009

Espoligotipo	***Número de amostras***
SB0295	41 (35,34%)
SB0121	38 (32,76%)
SB0120	16 (13,79%)
SB0140	12 (10,34%)
SB0881	9 (7,76%)
TOTAL	**116 (100%)**

A figura 4 traz os resultados do método *Spoligotyping* para amostras dos espoligotipos SB0120, SB0295, SB 0881, e também para as amostras padrão BCG de *M. bovis* e H37Rv de *M. tuberculosis*. E a Figura 5 dos espoligotipos SB0295, SB0121, SB0120, SB0140 e SB 0881. O quadro 5 mostra os perfis dos espoligotipos estudados, segundo notação internacional (www.mbovis.org).

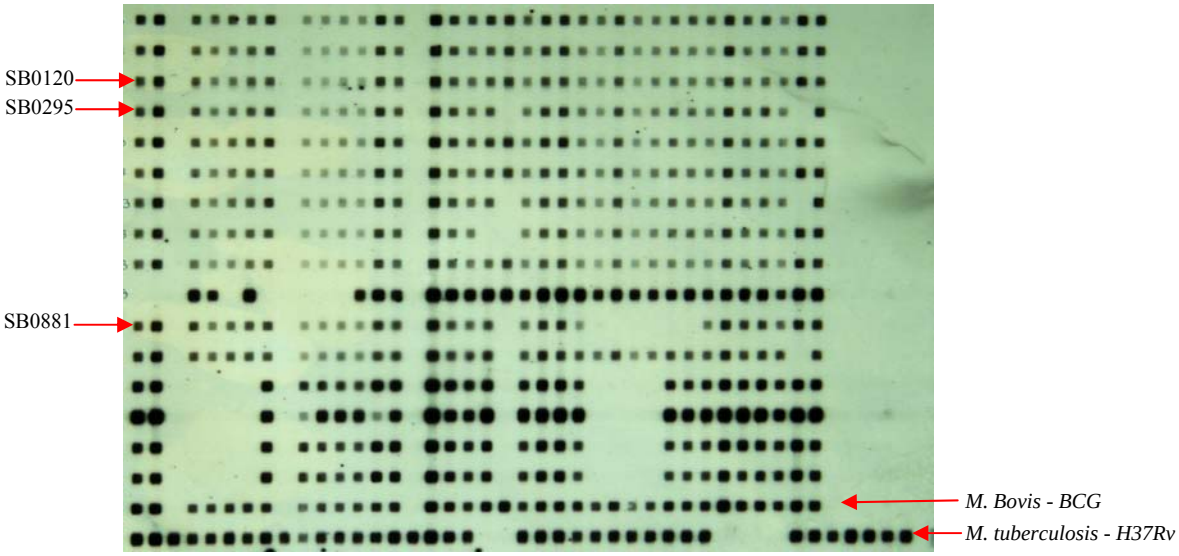

Figura 4 – Resultado do *Spoligotyping* com exemplos dos espoligotipos SB0120, SB0295, SB0881 e dos controles *M. bovis*-BCG e *M. tuberculosis*-H37Rv-São Paulo-2009

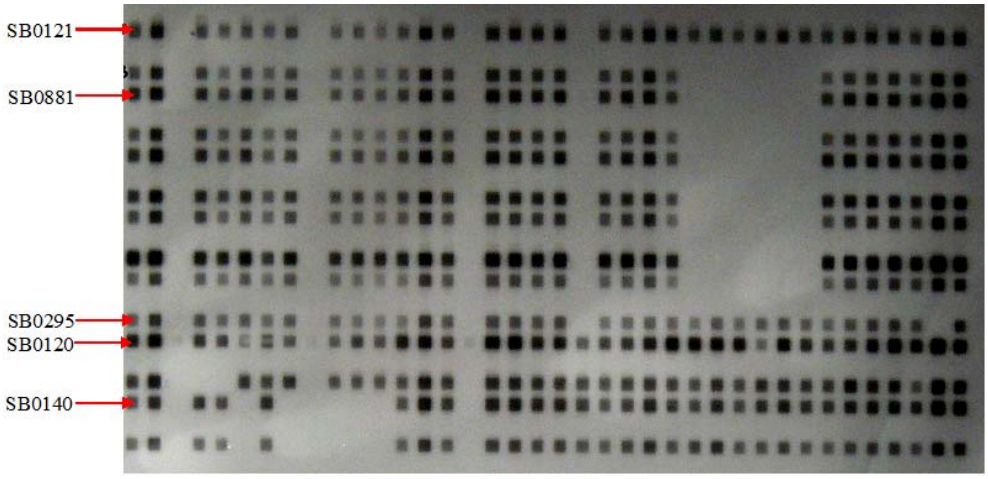

Figura 5 – Resultado do *Spoligotyping* com exemplos dos espoligotipos SB0121, SB0881, SB0295, SB0120 e SB0140-São Paulo-2009

Espoligotipo	***Perfil do espoligotipo***
SB0295	11011111011111101111011111111111111110100000
SB0121	11011111011111101111011111111111111111100000
SB0120	11011111011111101111111111111111111111100000
SB0140	11011010000011101111111111111111111111100000
SB0881	11011111011111101111011110000001111111100000

Quadro 5 – Perfil dos espoligotipos estudados segundo padrão internacional www.mbovis.org-São Paulo-2009

5.3 MIRU E ETR

As figuras 6 a 18 mostram os resultados de isolados de *M. bovis* para cada um dos 10 MIRU e dos três ETR utilizados para discriminá-los.

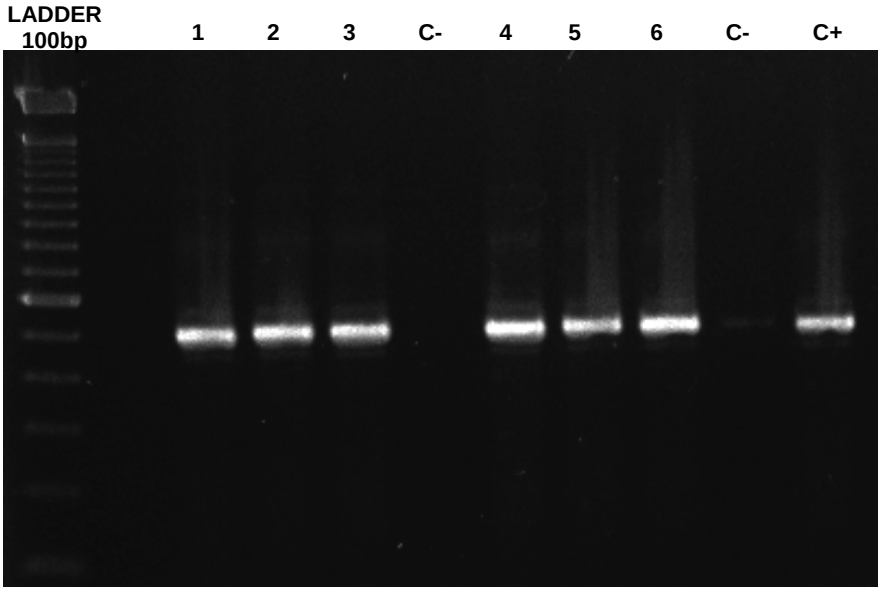

Figura 6 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 2 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

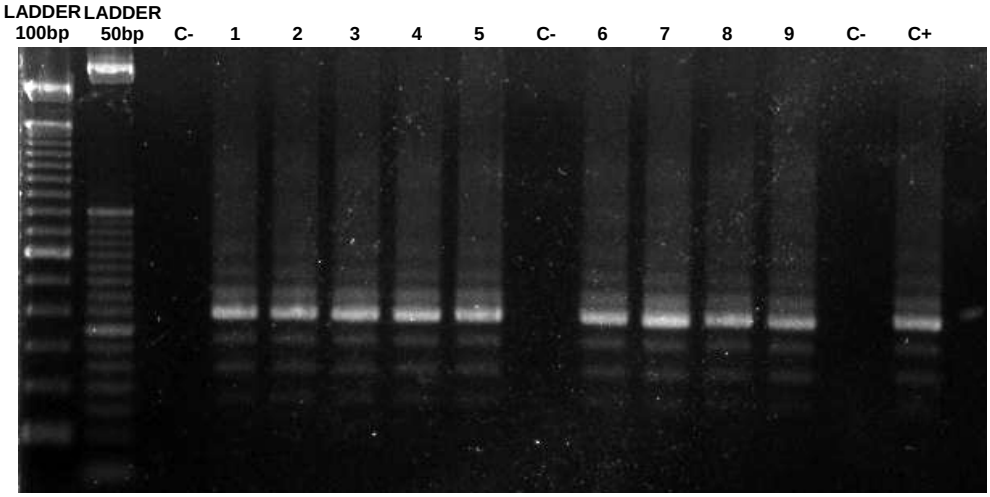

Figura 7 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 4 das amostras 1 a 9 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

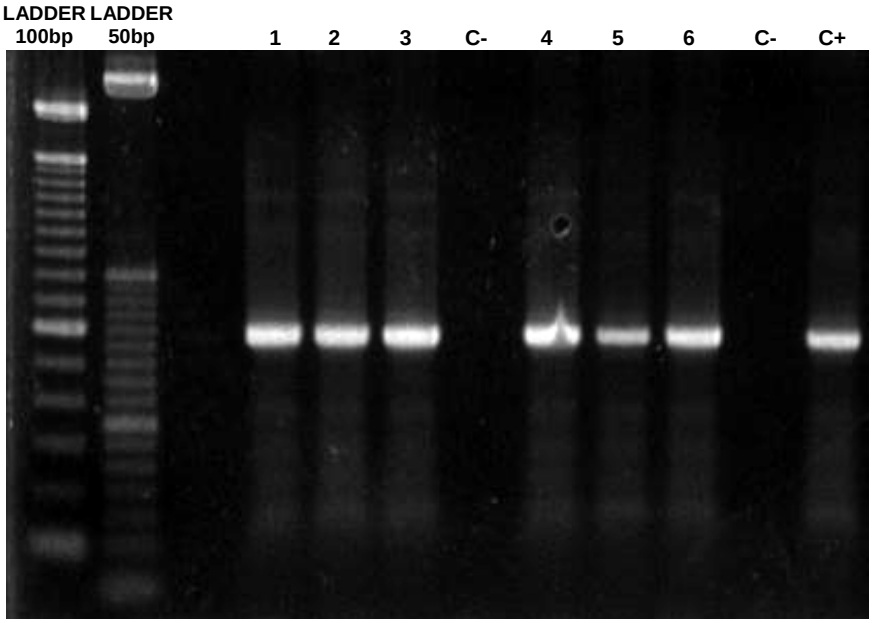

Figura 8 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 10 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

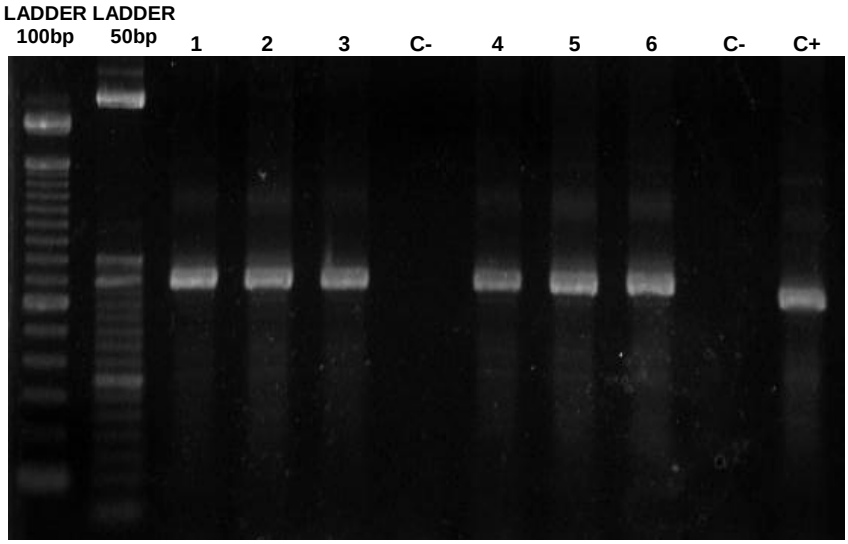

Figura 9 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 16 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

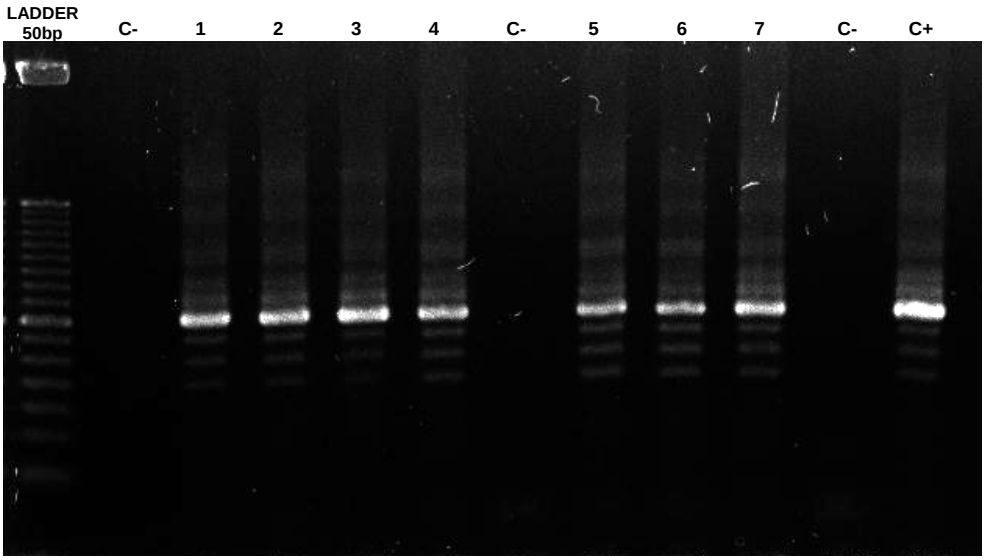

Figura 10 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 23 das amostras 1 a 7 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

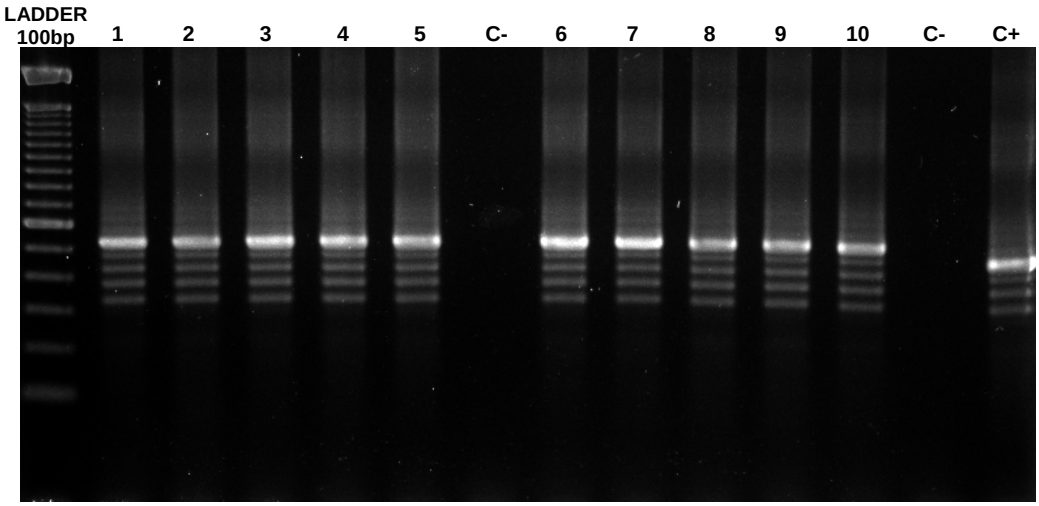

Figura 11 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 26 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

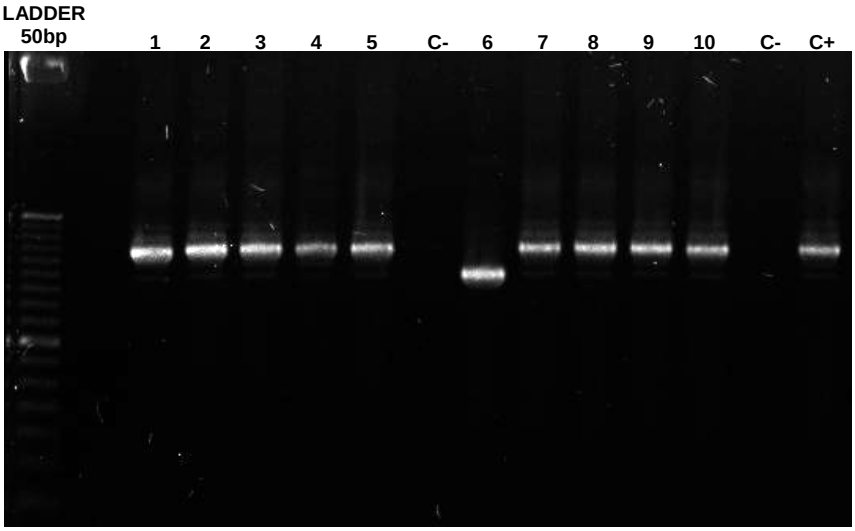

Figura 12 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 27 das amostras 1 a 10 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

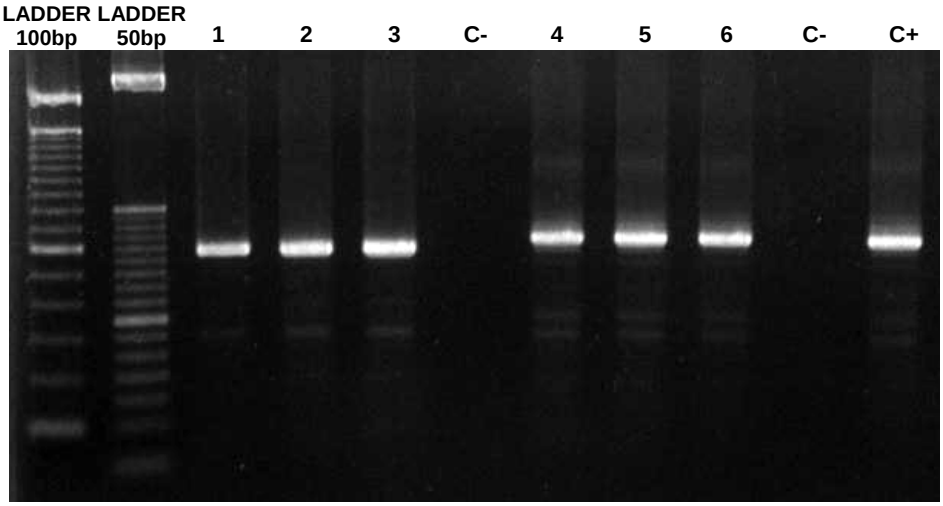

Figura 13 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 31 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

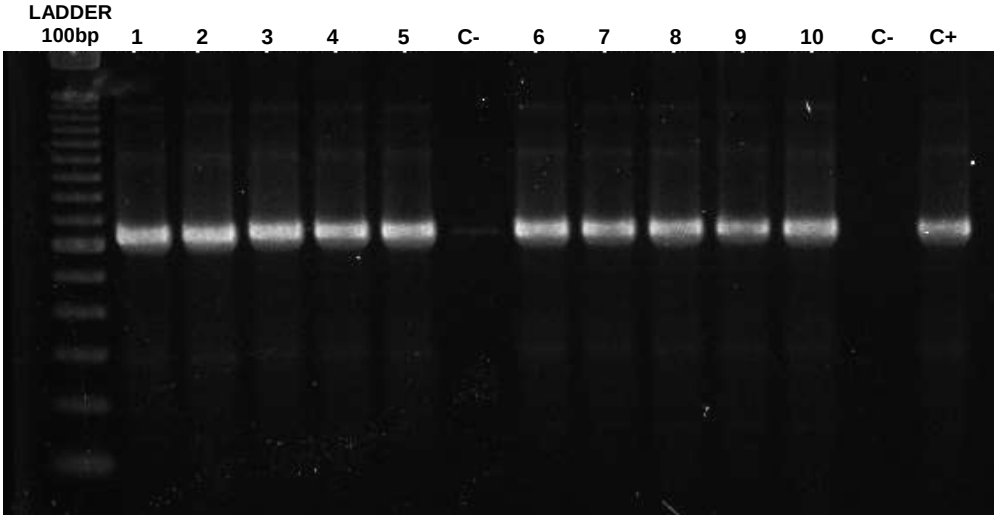

Figura 14 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 39 das amostras 1 a 10 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

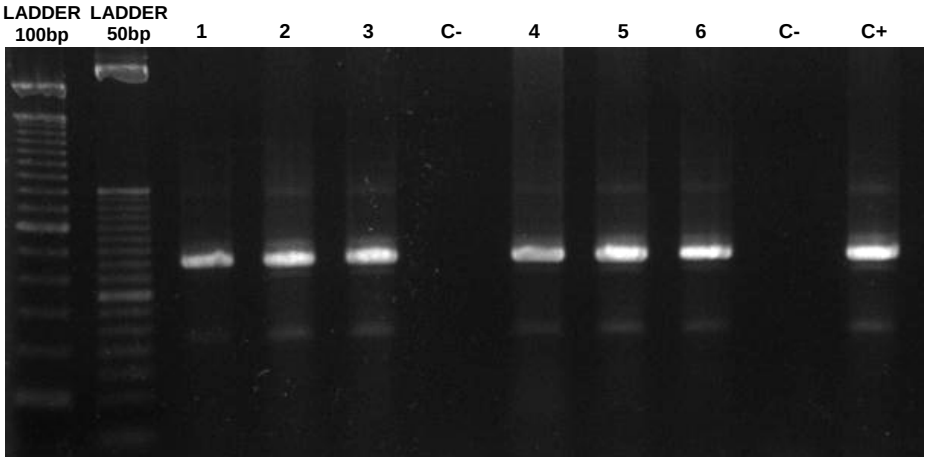

Figura 15 – Gel de agarose mostrando resultados para o MIRU 40 das amostras 1 a 6 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

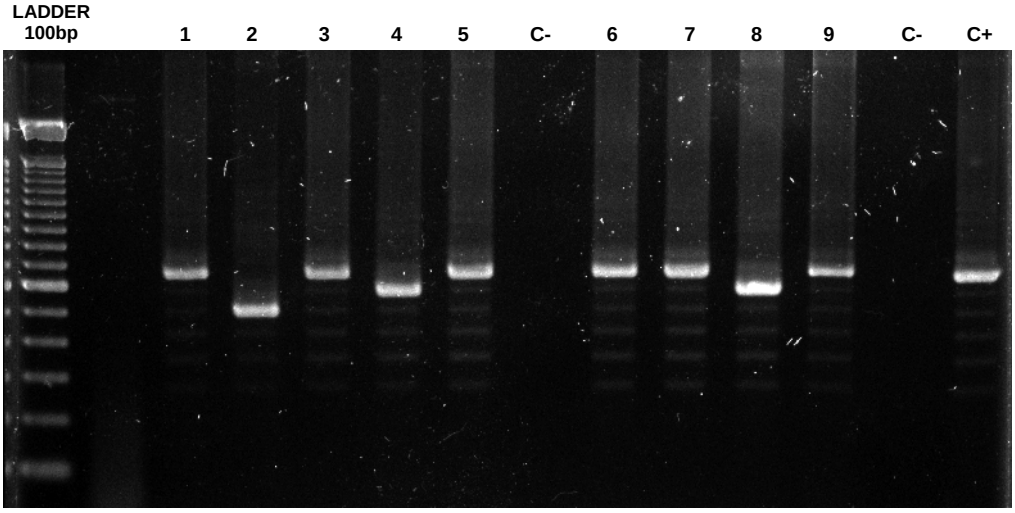

Figura 16 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR A das amostras 1 a 9 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

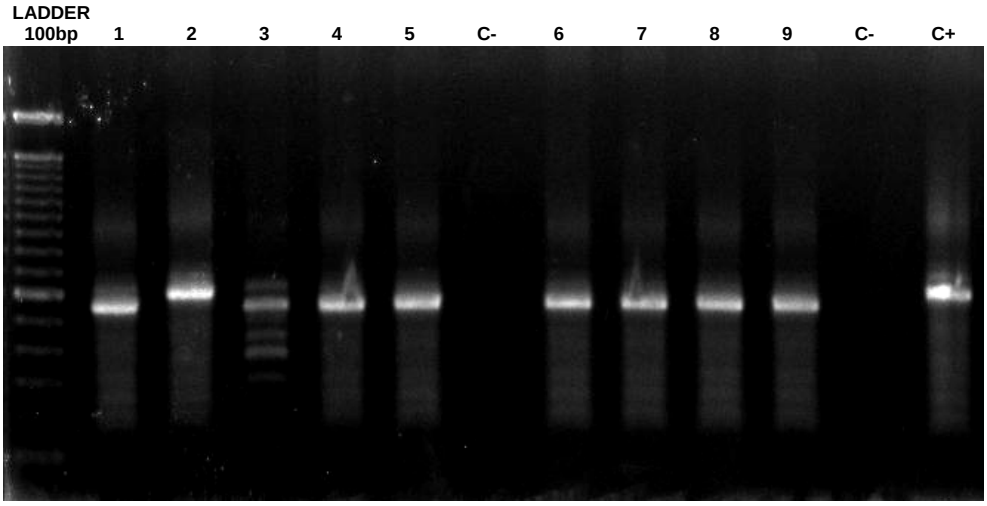

Figura 17 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR B das amostras 1 a 9 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

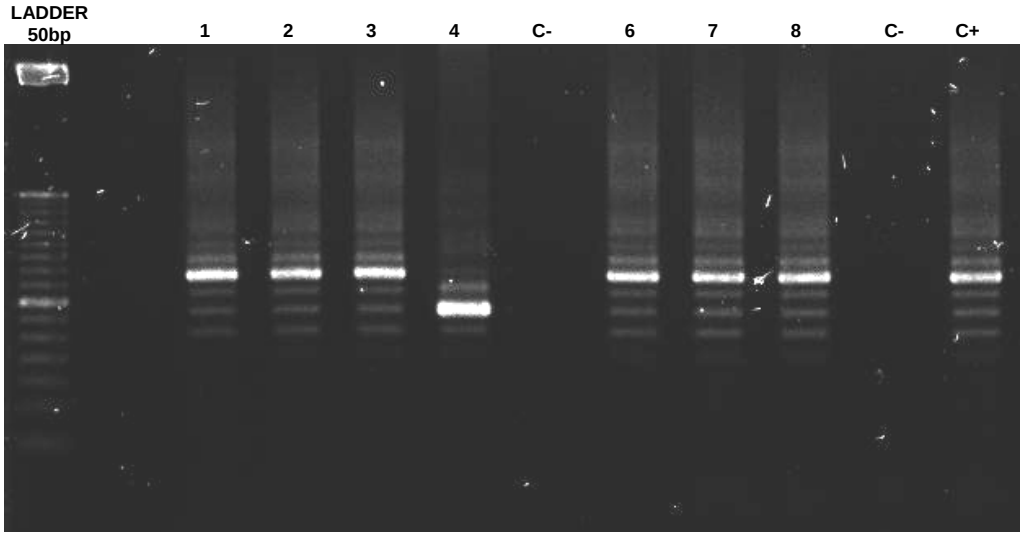

Figura 18 – Gel de agarose mostrando resultados para o ETR C das amostras 1 a 8 e dos controles positivo (C+) e negativo (C-)-São Paulo-2009

Os MIRU 20 e 24 foram ensaiados, porém excluídos em virtude de apresentarem problemas durante a realização do nosso estudo. Problemas estes relacionados à não amplificação dos loci em questão (não obtenção de produto amplificado) ou amplificação de mais de uma região do genoma (observação de várias bandas na eletroforese). O mesmo problema já foi detectado por outros autores, que também excluíram o MIRU 20 de suas análises (KREMER et al., 2005b).

Os resultados para os métodos de *Spoligotyping*, MIRU e ETR em 116 isolados de *M. bovis* constam da tabela 4.

Tabela 4 - Amostras, segundo espoligotipos, número de alelos em cada locus de MIRU e ETR-São Paulo-2009

N. amostra	Espoligotipos	N. alelos (MIRU e ETR)																																								
		2	4	10	16				23		26						27				31			39		40		ETR A						ETR B					ETR C		
		a=2	a=3	a=2	a=2	b=3	c=4	d=5	a=2	b=4	a=1	b=2	c=3	d=4	e=5	f=6	g=7	a=1	b=2	c=3	d=4	a=2	b=3	c=4	a=1	b=2	a=1	b=2	c=3	a=2	b=3	c=4	d=5	e=6	f=7	a=5	b=6	c=7	d=8	e=9	a=5	b=7	c=8
30/02	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
22/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
36/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
63/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
101/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
117/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
133/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
137/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
156/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
239/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
344/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
405/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
01/04	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
22/02	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p				p	
29/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p				p	
96/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p				p	
399/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p				p	
500/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p				p	
18/03	sb0121	p	p	p			p			p					p					p			p			p		p						p				p				p	
389/03	sb0121	p	p	p			p			p					p					p			p			p		p						p				p				p	
486/03	sb0121	p	p	p			p			p					p					p			p			p		p						p				p				p	
02/02	sb0121	p	p	p		p				p				p						p			p			p		p						p				p				p	
19/02	sb0121	p	p	p		p				p				p						p			p			p		p						p				p				p	
15/02	sb0121	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p				p				p	
132/03	sb0121	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p				p				p	
493/03	sb0121	p	p	p	p					p					p					p			p			p		p						p				p				p	
06/04	sb0121	p	p	p	p					p					p					p			p			p		p						p				p				p	
11/02	sb0121	p	p	p	p					p				p						p			p			p		p				p							p			p	
12/02	sb0121	p	p	p	p					p					p				p				p			p		p						p				p			p		
34/03	sb0121	p	p	p		p			p						p					p			p			p	p							p			p					p	
56/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p		p				p		p						p				p				p	
100/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p				p		p		p				p						p				p	
134/03	sb0121	p	p	p		p				p				p						p				p		p		p				p						p				p	
136/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p			p		
271/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p				p						p			p		
312/03	sb0121	p	p	p		p				p					p					p			p			p	p							p				p				p	
314/03	sb0121	p	p	p	p					p				p						p			p			p		p						p				p				p	
390/03	sb0121	p	p	p				p		p					p					p			p			p		p						p				p				p	
33/02	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
03/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
16/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
74/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
81/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
142/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
278/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
03/02	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p			p		
09/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p			p		
85/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p			p		
112/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p			p		
47/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p		p								p			p		
97/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p		p								p			p		
01/03	sb0295	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p				p				p	
02/03	sb0295	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p				p				p	
10/03	sb0295	p	p	p	p					p					p					p			p			p		p							p				p			p	
295/03	sb0295	p	p	p	p					p					p					p			p			p		p							p				p			p	
252/03	sb0295	p	p	p		p				p						p				p			p			p		p						p					p			p	
288/03	sb0295	p	p	p		p				p						p				p			p			p		p						p					p			p	
04/03	sb0295	p	p	p		p				p				p						p			p			p		p						p				p				p	
224/03	sb0295	p	p	p		p				p				p						p			p			p		p						p				p				p	
17/02	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p				p	

Continua no verso→

→continuação

N. amostra	Espoligotipos	N. alelos (MIRU e ETR)																																									
		2	4	10	16				23		26							27				31			39		40			ETR A						ETR B					ETR C		
		a=2	a=3	a=2	a=2	b=3	c=4	d=5	a=2	b=4	a=1	b=2	c=3	d=4	e=5	f=6	g=7	a=1	b=2	c=3	d=4	a=2	b=3	c=4	a=1	b=2	a=1	b=2	c=3	a=2	b=3	c=4	d=5	e=6	f=7	a=5	b=6	c=7	d=8	e=9	a=5	b=7	c=8
116/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p				p						p				p	
129/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p				p				p		
151/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p			p							p				p	
176/03	sb0295	p	p	p	p					p					p					p			p			p		p						p				p				p	
191/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p				p		p		p						p				p					P
215/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p			p					p				p				p	
226/03	sb0295	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p					p			p	
300/03	sb0295	p	p	p	p					p					p					p			p			p		p						p					p			p	
319/03	sb0295	p	p	p			p			p					p			p					p			p		p						p				p				p	
325/03	sb0295	p	p	p			p			p						p				p			p			p		p						p					p			p	
337/03	sb0295	p	p	p	p					p				p						p			p			p		p							p						p		p	
339/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p			p					p	
342/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p				p	
407/03	sb0295	p	p	p		p				p			p							p			p			p		p					p					p			p		
522/03	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p			p				p		
04/04	sb0295	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p				p	
18/02	sb0120	p	p	p		p				p					p			p				p				p		p							p			p				p	
64/03	sb0120	p	p	p		p				p					p			p				p				p		p							p			p				p	
60/03	sb0120	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p		p						p	
385/03	sb0120	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p		p						p	
516/03	sb0120	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
517/03	sb0120	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
13/03	sb0120	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p				p				p	
32/03	sb0120	p	p	p		p				p		p						p				p				p		p							p			p				p	
33/03	sb0120	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p							p	p						p	
37/03	sb0120	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p			p								p			p	
62/03	sb0120	p	p	p		p				p			p					p					p			p		p						p				p			p		
65/03	sb0120	p	p	p		p				p			p					p					p			p		p						p				p				p	
110/03	sb0120	p	p	p		p				p			p					p						p		p		p						p		p					p		
341/03	sb0120	p	p	p		p				p			p					p				p			p			p						p		p						p	
495/03	sb0120	p	p	p	p					p		p						p					p			p		p							p				p			p	
508/03	sb0120	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p					p					p			p		
188/03	sb0881	p	p	p		p				p	p									p			p			p		p						p				p			p		
404/03	sb0881	p	p	p		p				p	p									p			p			p		p						p				p			p		
45/03	sb0881	p	p	p		p				p			p							p			p			p		p						p		p					p		
77/03	sb0881	p	p	p		p				p			p							p			p			p		p					p					p			p		
121/03	sb0881	p	p	p		p				p			p							p			p			p		p				p						p			p		
182/03	sb0881	p	p	p		p				p					p			p					p			p		p						p				p			p		
255/03	sb0881	p	p	p		p				p			p							p			p			p		p						p				p			p		
279/03	sb0881	p	p	p		p				p				p						p			p			p		p						p		p					p		
521/03	sb0881	p	p	p		p				p					p					p			p			p		p						p				p				p	
21/02	sb0140	p	p	p			p			p				p					p					p		p		p					p					p				p	
25/02	sb0140	p	p	p			p			p		p									p		p			p		p							p			p				p	
31/02	sb0140	p	p	p		p				p			p							p			p			p		p				p				p						p	
05/03	sb0140	p	p	p			p			p		p									p		p			p		p							p				p			p	
06/03	sb0140	p	p	p		p				p				p						p			p			p		p							p				p			p	
25/03	sb0140	p	p	p		p				p				p						p			p			p		p						p				p			p		
31/03	sb0140	p	p	p				p		p		p									p		p			p		p						p				p				p	
44/03	sb0140	p	p	p				p		p		p								p		p				p		p						p				p			p		
83/03	sb0140	p	p	p			p			p							p				p		p			p		p						p					p		p		
301/03	sb0140	p	p	p			p			p							p				p		p			p		p							p				p			p	
338/03	sb0140	p	p	p			p			p					p					p			p			p		p				p							p			p	
356/03	sb0140	p	p	p				p		p						p				p			p			p		p				p							p			p	

5.4 DIVERSIDADE ALÉLICA

A tabela 5 mostra o número de ocorrências de alelos das 116 amostras de *M. bovis* nos resultados dos métodos MIRU e ETR. O quadro 6 traz os resultados da análise da diversidade alélica.

Tabela 5 – Número de ocorrências dos alelos dos MIRU e ETR e a diversidade alélica de cada locus-São Paulo-2009

MIRU/ETR	**Número de alelos**										**Diversidade alélica (*h*)**
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MIRU 2	-	-	116	-	-	-	-	-	-	-	-0,0087
MIRU 4	-	-	-	116	-	-	-	-	-	-	-0,0087
MIRU 10	-	-	116	-	-	-	-	-	-	-	-0,0087
MIRU 16	-	-	11	90	11	4	-	-	-	-	0,373463
MIRU 23	-	-	1	-	115	-	-	-	-	-	0,008546
MIRU 26	-	2	6	12	12	78	4	2	-	-	0,517841
MIRU 27	-	21	2	88	5	-	-	-	-	-	0,384258
MIRU 31	-	-	6	105	5	-	-	-	-	-	0,168966
MIRU 39	-	1	115	-	-	-	-	-	-	-	0,008546
MIRU 40	-	2	113	1	-	-	-	-	-	-	0,042429
ETR A	-	-	2	2	9	13	78	12	-	-	0,513793
ETR B	-	-	-	-	-	8	5	86	16	1	0,41964
ETR C	-	-	-	-	-	27	-	88	1	-	0,364768

MIRU/ETR	**Polimorfismo**
MIRU 2	Baixo
MIRU 4	Baixo
MIRU 10	Baixo
MIRU 16	Intermediário
MIRU 23	Baixo
MIRU 26	Intermediário
MIRU 27	Intermediário
MIRU 31	Baixo
MIRU 39	Baixo
MIRU 40	Baixo
ETR A	Intermediário
ETR B	Intermediário
ETR C	Intermediário

Quadro 6 – Grau de polimorfismo de cada locus estudado-São Paulo-2009

5.5 GRAU DE DISCRIMINAÇÃO DAS TÉCNICAS

A tabela 6 mostra o resultado do poder de discriminação pelo HGI dos métodos moleculares isoladamente e em associação, aplicados nas 116 amostras de *M. bovis* estudadas.

Tabela 6 – Poder discriminatório do *Spoligotyping*, do MIRU e do ETR, utilizados isoladamente e em combinações-São Paulo-2009

MÉTODO	**HGI**
Spoligotyping	0,73838
MIRU	0,82983
ETR	0,82533
Spoligotyping+MIRU	0,93058
Spoligotyping+ETR	0,93103
MIRU+ETR	0,95337
Spoligotyping+MIRU+ETR	0,98051

5.6 ANÁLISE ESPACIAL

A tabela 7 mostra os resultados de discriminação molecular dos isolados de *M. bovis* para os 66 focos.

Tabela 7 – Amostras, segundo espoligotipos, notações adotadas para as análises e localizações geográficas-São Paulo-2009

N. AMOSTRA	Espoligotipos (ESP)	Notação adotada							LATITUDE	LONGITUDE
		ESP	MIRU	ETR	ESP+MIRU	ESP+ETR	MIRU+ETR	ESP+MIRU+ETR		
06/04	SB0121	a	4	1	a6	a1	7	a6	-20,689222	-50,3978333
132/03	SB0121	a	2	1	a3	a1	5	a5	-21,708277	-49,354194
133/03	SB0121	a	1	1	a1	a1	1	a1	-21,2016388	-48,275222
136/03	SB0121	a	1	2	a1	a4	3	a13	-20,783611	-50,525611
15/02	SB0121	a	2	1	a3	a1	5	a5	-21,2581388	-48,46700277
18/03	SB0121	a	5	1	a2	a1	6	a3	-21,230833	-49,891555
19/02	SB0121	a	8	1	a5	a1	4	a4	-21,4778611	-49,734166
22/02	SB0121	a	1	3	a1	a2	2	a2	-20,639777	-49,3843055
22/03	SB0121	a	1	1	a1	a1	1	a1	-20,5166944	-47,2444444
239/03	SB0121	a	1	1	a1	a1	1	a1	-21,5134166	-51,785638
29/03	SB0121	a	1	3	a1	a2	2	a2	-22,089166	-48,711388
30/02	SB0121	a	1	1	a1	a1	1	a1	-21,31363888	-50,332944
314/03	SB0121	a	7	1	a4	a1	25	a16	-20,769638	-49,97055
36/03	SB0121	a	1	1	a1	a1	1	a1	-20,433355	-49,592388
389/03	SB0121	a	5	1	a2	a1	6	a3	-21,7933055	-49,260361
390/03	SB0121	a	22	1	a13	a1	26	a17	-21,605138	-48,394944
399/03	SB0121	a	1	3	a1	a2	2	a2	-20,65686	-50,038027
405/03	SB0121	a	1	1	a1	a1	1	a1	-20,1588333	-50,7746388
486/03	SB0121	a	5	1	a2	a1	6	a3	-20,337222	-49,9894166
500/03	SB0121	a	1	3	a1	a2	2	a2	-21,809083	-46,969055
56/03	SB0121	a	19	1	a9	a1	20	a10	-22,091666	-49,708333
01/03	SB0295	b	2	1	b3	b1	5	b4	-21,313611	-50,3329166
03/02	SB0295	b	1	2	b1	b2	3	b2	-20,38661111	-49,966666
03/03	SB0295	b	1	1	b1	b1	1	b1	-21,313611	-50,3329166
09/03	SB0295	b	1	2	b1	b2	3	b2	-20,769944	-49,72275
10/03	SB0295	b	4	4	b2	b6	10	b5	-20,7558611	-49,99330555

Continua no verso→

→continuação

N. AMOSTRA	Espoligotipos (ESP)	Notação adotada							LATITUDE	LONGITUDE
		ESP	MIRU	ETR	ESP+MIRU	ESP+ETR	MIRU+ETR	ESP+MIRU+ETR		
112/03	SB0295	b	1	2	b1	b2	3	b2	-22,348888	-50,0993611
129/03	SB0295	b	1	17	b1	b10	30	b13	-20,0285277	-49,613027
142/03	SB0295	b	1	1	b1	b1	1	b1	-21,923888	-50,344166
17/02	SB0295	b	1	3	b1	b5	2	b8	-20,317777	-50,2043333
176/03	SB0295	b	4	1	b2	b1	7	b15	-22,32044	-49,0169722
191/03	SB0295	b	10	19	b8	b12	32	b16	-20,26777778	-49,19944444
215/03	SB0295	b	23	1	b9	b1	33	b17	-20,30308	-48,85105
226/03	SB0295	b	9	5	b10	b3	34	b18	-20,8559166	-50,2634166
278/03	SB0295	b	1	1	b1	b7	1	b1	-20,081111	-50,50611
288/03	SB0295	b	11	5	b6	b3	11	b6	-20,156138	-50,23025
295/03	SB0295	b	4	4	b2	b6	10	b5	-23,410222	-49,408555
319/03	SB0295	b	24	1	b11	b7	36	b20	-21,55266	-50,3950833
325/03	SB0295	b	25	5	b12	b13	37	b21	-22,4241111	-49,1950277
33/02	SB0295	b	1	1	b1	b1	1	b1	-21,307055	-49,5121666
339/03	SB0295	b	1	9	b1	b8	39	b23	-23,0360277	-47,239277
407/03	SB0295	b	3	10	b5	b15	8	b25	-20,2603611	-49,967166
47/03	SB0295	b	1	11	b1	b4	9	b3	-22,1267777	-48,657633
74/03	SB0295	b	1	1	b1	b1	1	b1	-20,536755	-47,315755
81/03	SB0295	b	1	1	b1	b1	1	b1	-21,772277	-49,271222
85/03	SB0295	b	1	2	b1	b2	3	b2	-22,989888	-46,425833
110/03	SB0120	c	26	8	c5	c8	47	c10	-21,703077	-49,43722
13/03	SB0120	c	2	1	c1	c1	42	c4	-20,897166	-48,6044160
18/02	SB0120	c	12	6	c2	c2	13	c1	-20,0583611	-50,379611
32/03	SB0120	c	31	6	c6	c2	43	c5	-21,3103611	-49,0459166
33/03	SB0120	c	2	22	c1	c4	44	c6	-21,3103611	-49,0459166
37/03	SB0120	c	2	23	c1	c5	45	c7	-22,048444	-51,502972
508/03	SB0120	c	1	10	c3	c10	50	c13	-22,44566	-50,5944166
517/03	SB0120	c	1	1	c3	c1	1	c3	-20,14925	-49,96588
64/03	SB0120	c	12	6	c2	c2	13	c1	-22,1366388	-48,1273055
121/03	SB0881	d	3	15	d1	d4	52	d4	-23,60925	-49,422638
188/03	SB0881	d	13	2	d2	d1	15	d1	-21,677944	-48,643305
255/03	SB0881	d	3	2	d1	d1	54	d6	-24,4133611	-47,68144
279/03	SB0881	d	8	8	d4	d2	55	d7	-20,219333	-49,921055
45/03	SB0881	d	3	8	d1	d2	51	d2	-22,871555	-49,315111

Continua no verso→

→continuação

N. AMOSTRA	Espoligotipos (ESP)	Notação adotada							LATITUDE	LONGITUDE
		ESP	MIRU	ETR	ESP+MIRU	ESP+ETR	MIRU+ETR	ESP+MIRU+ETR		
521/03	SB0881	d	1	14	d5	d5	1	d8	-21,0141666	-50,1286111
21/02	SB0140	e	27	3	e4	e4	56	e1	-21,771222	-50,068277
25/02	SB0140	e	14	6	e1	e5	57	e2	-20,848888	-48,2906944
25/03	SB0140	e	6	2	e2	e2	61	e6	-22,2363888	-50,7375555
31/02	SB0140	e	3	25	e5	e6	58	e3	-22,148277	-50,6272777
338/03	SB0140	e	5	13	e8	e3	66	e11	-23,0360277	-47,239277

As figuras 19, 20 e 21 trazem os mapas com as localizações espaciais dos 66 focos de tuberculose bovina adicionados da discriminação molecular dos isolados de *M. bovis* grassantes pelas técnicas de *Spoligotyping*, MIRU e ETR.

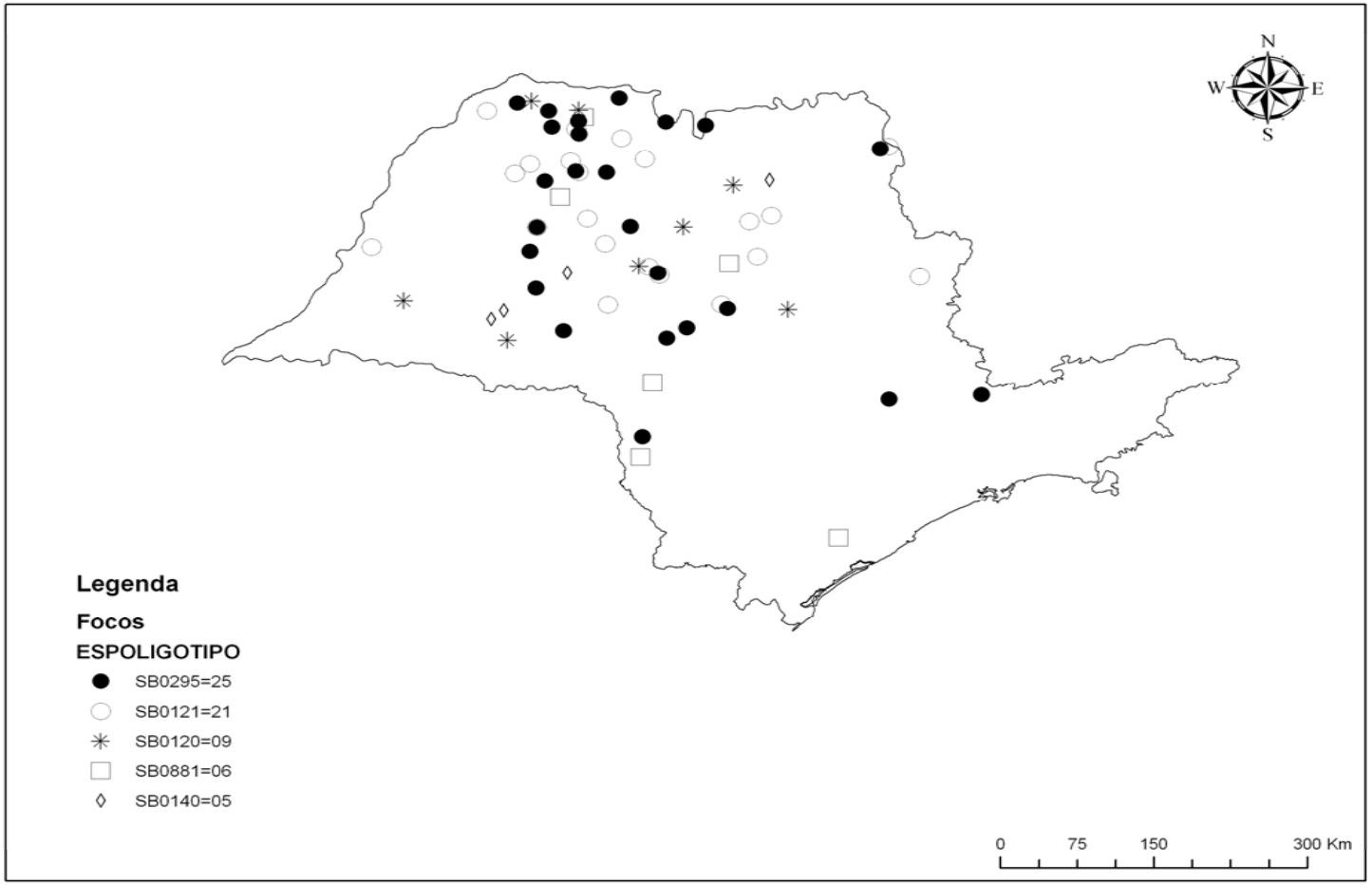

Figura 19 – Localizações espaciais de 66 focos de isolados de *M. bovis* do estado de São Paulo, discriminados pela técnica de *Spoligotyping*-São Paulo-2009

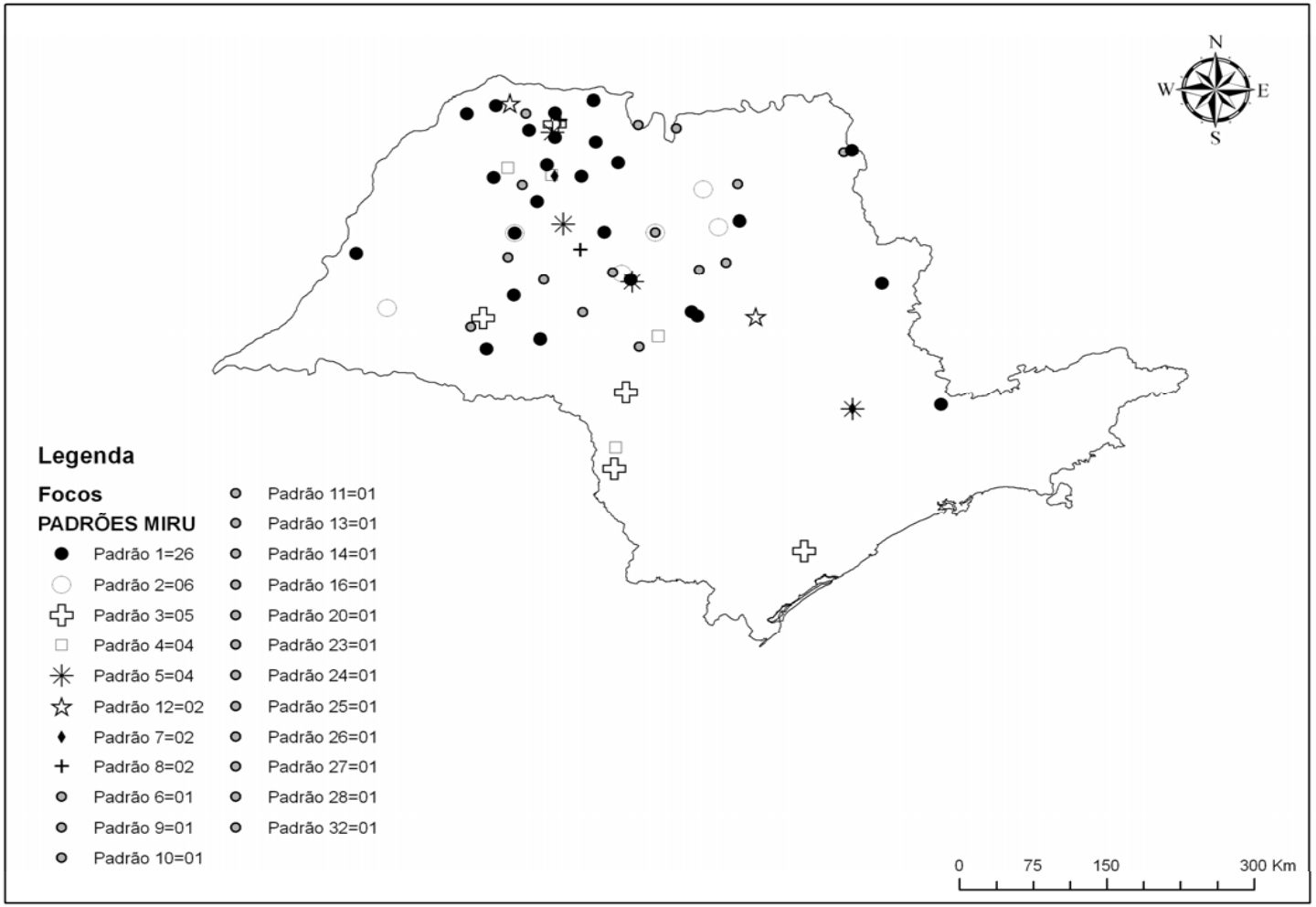

Figura 20 – Localizações espaciais de 66 focos de isolados de *M. bovis* do estado de São Paulo, discriminados pela técnica de MIRU-São Paulo 2009

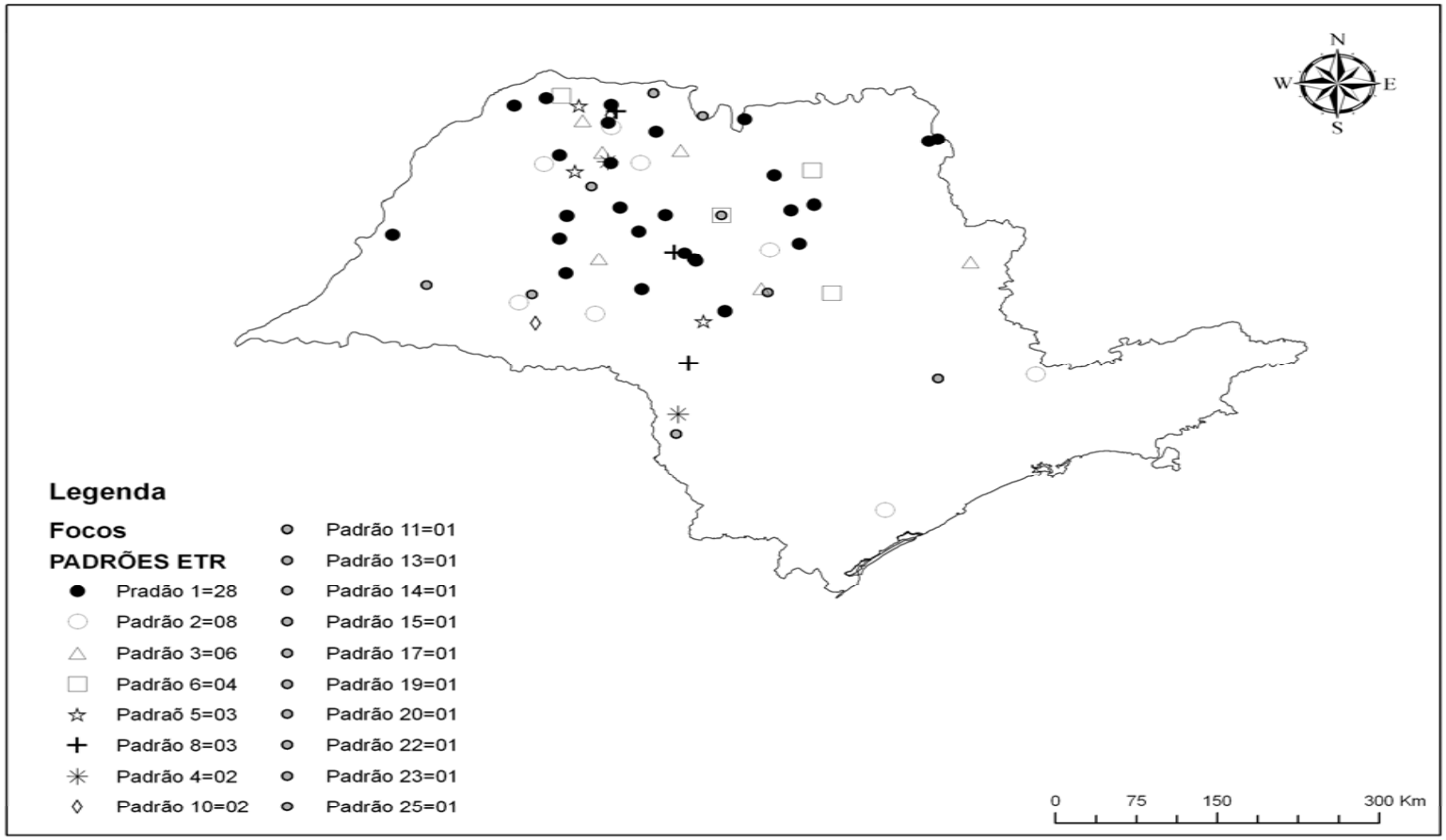

Figura 21 – Localizações espaciais de 66 focos de isolados de *M. bovis* do estado de São Paulo, discriminadas pela técnica de ETR-São Paulo-2009

Foram realizadas 63 análises espaciais, sendo que em nenhuma delas foi detectada a formação de agrupamento de focos. Os gráficos 1, 2, 3 e 4 trazem os resultados das análises espaciais observadas para o espoligotipo SB0295, o padrão de MIRU 16 (Tabela 7), o padrão de ETR 4 (Tabela 7) e o padrão a6 da combinação do espoligotipo SB0121 com os MIRU e os ETR (Tabela 7).

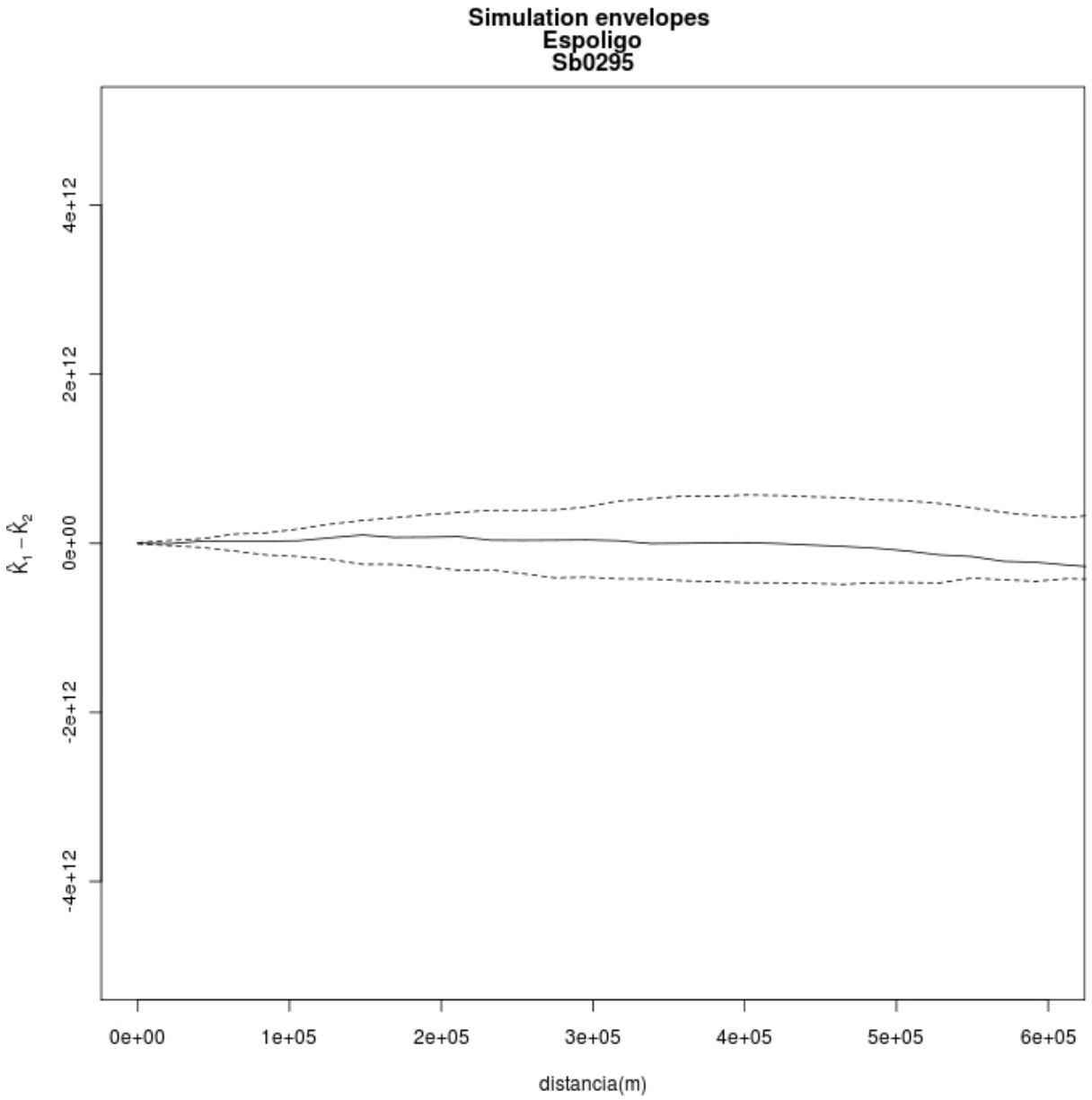

Gráfico 1 – Resultado da análise espacial para o Espoligotipo SB0295-São Paulo-2009

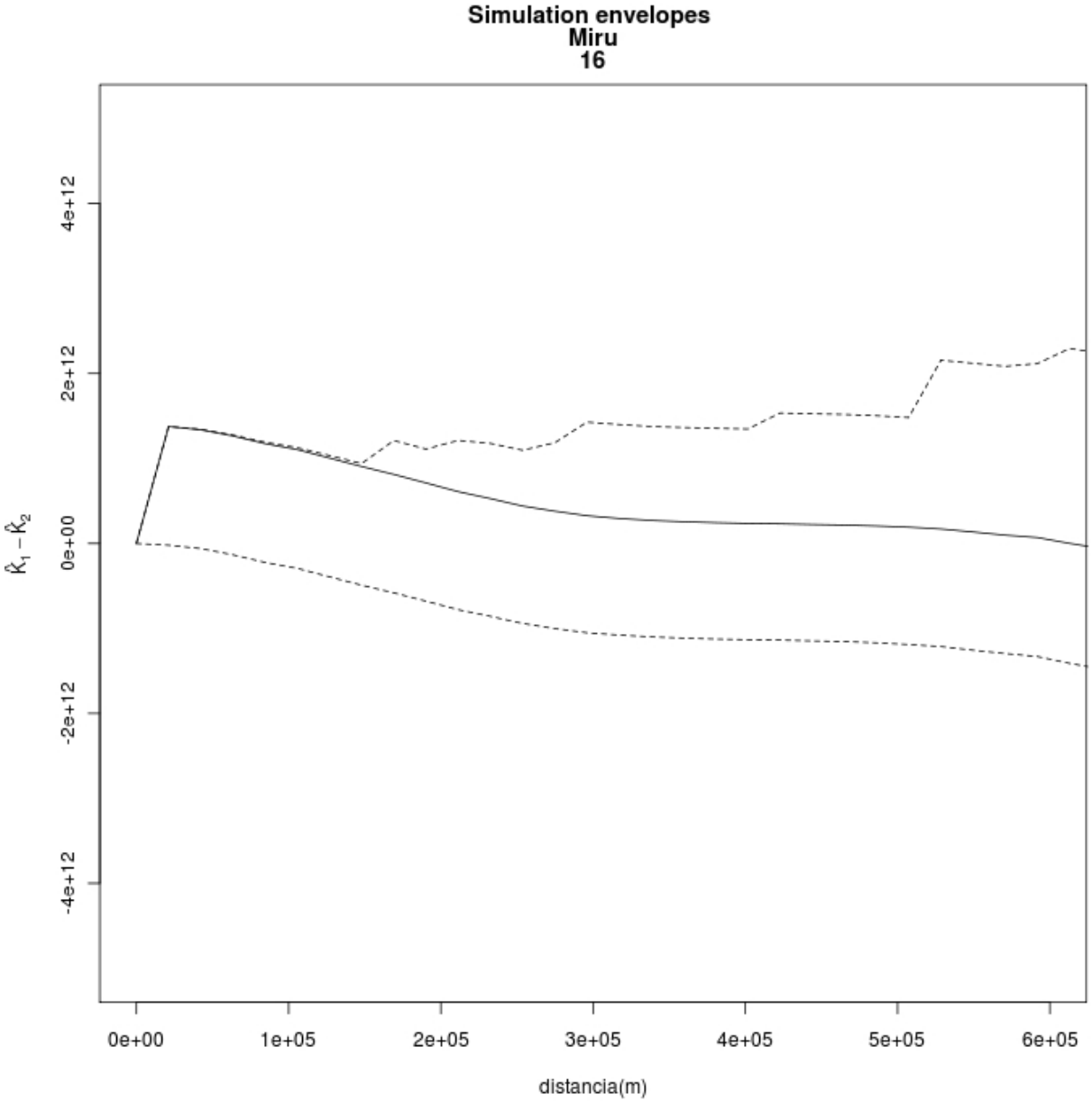

Gráfico 2 – Resultado da análise espacial para o padrão 16 de MIRU-São Paulo-2009

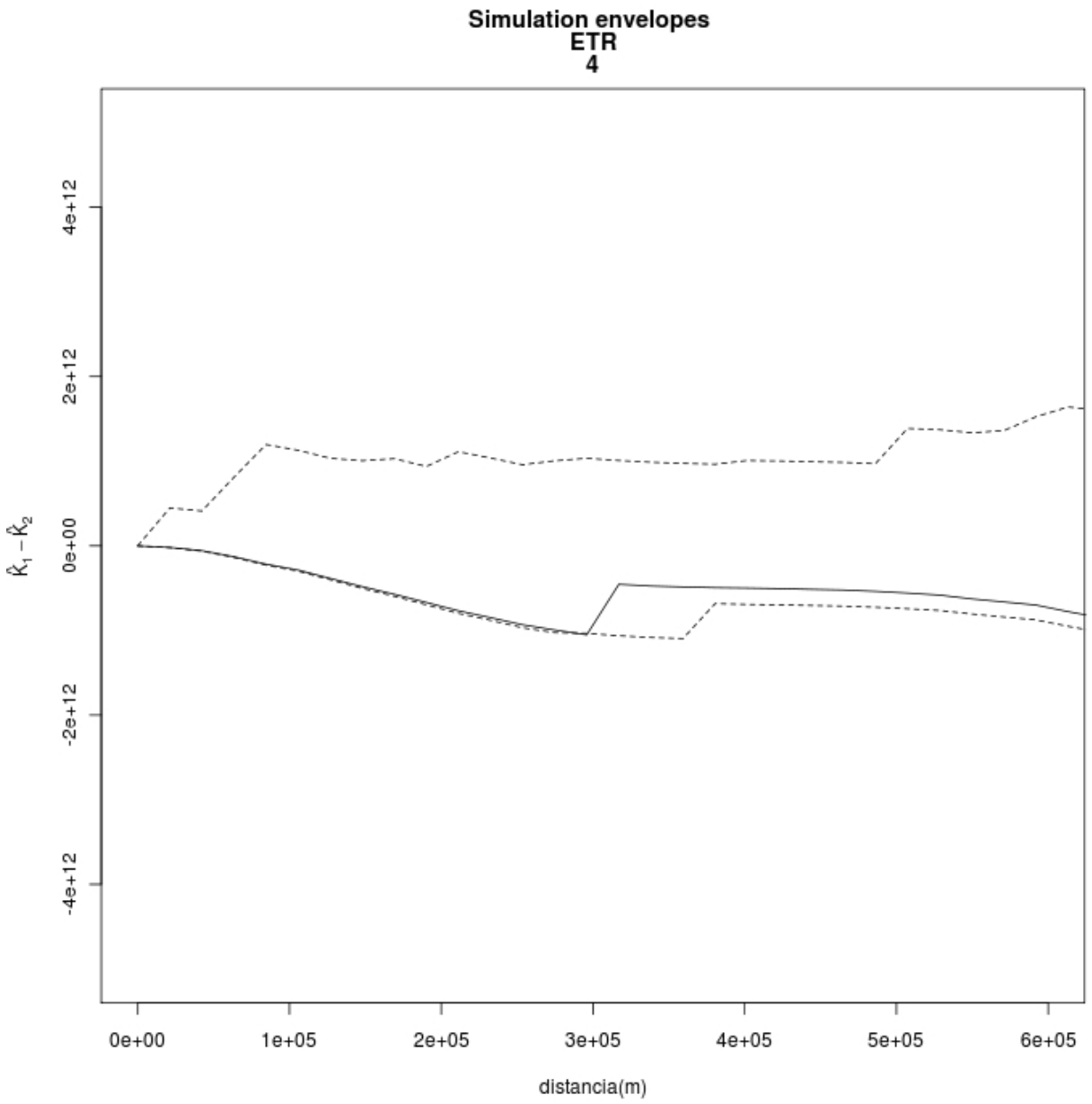

Gráfico 3 – Resultado da análise espacial para o padrão 4 de ETR-São Paulo-2009

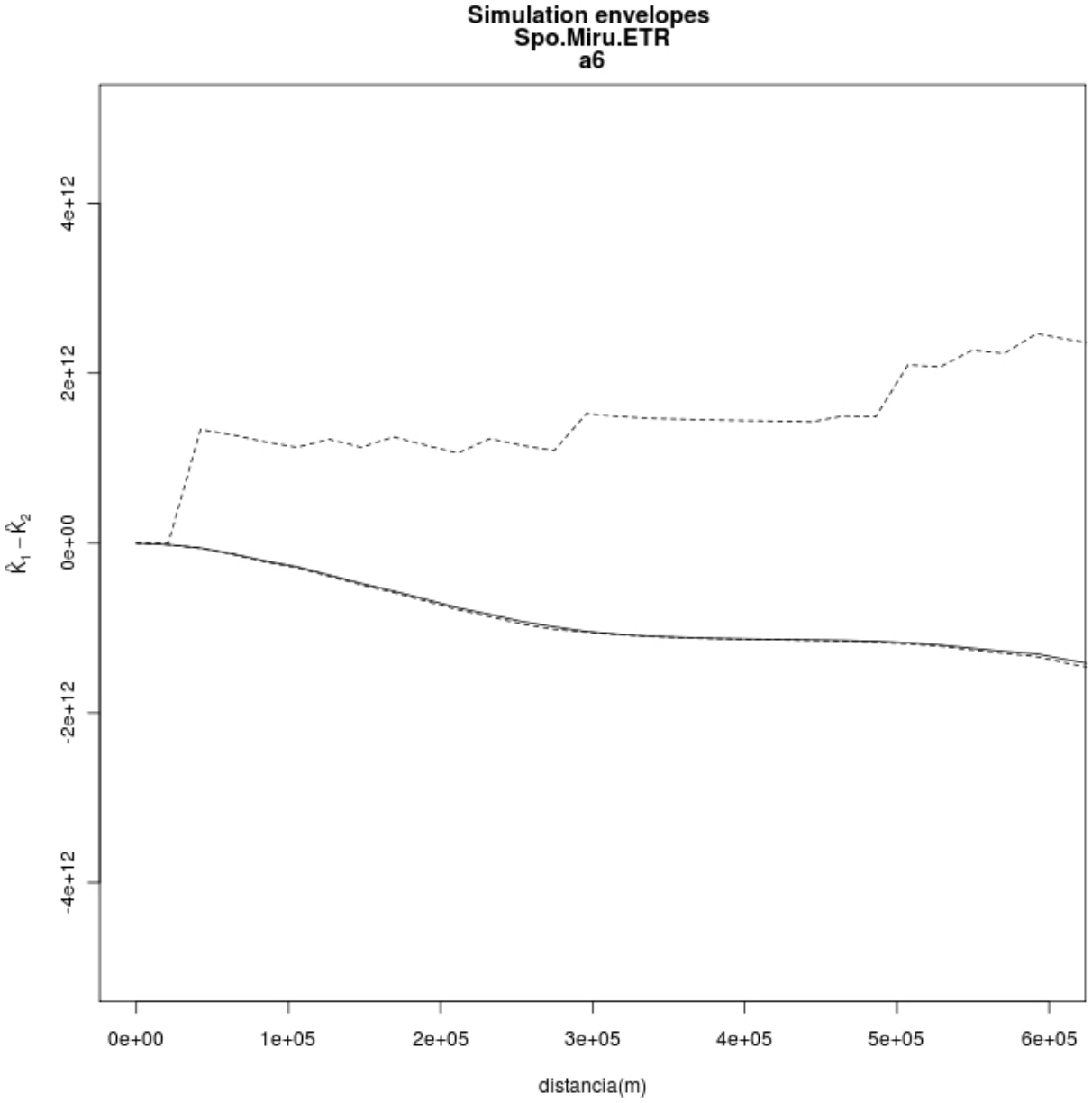

Gráfico 4 – Resultado da análise espacial para o padrão a6 da combinação do *Spoligotyping* S0121 com os MIRU e os ETR-São Paulo-2009

6 DISCUSSÃO

A escolha dos isolados foi em função dos resultados do método *Spoligotyping*. Foram selecionados os cinco espoligotipos mais frequentes (SB0121, SB0295, SB0120, SB0140 e SB0881) obtidos de bovinos abatidos no Estado de São Paulo em estudo de Rodriguez et al. (2004).

O espoligotipo SB0121 já foi referido como majoritário na Espanha, México e Portugal (ARANAZ et al., 1996; COBOS-MARIN et al., 2005; DUARTE et al., 2008). Esse espoligotipo também já foi detectado no Brasil, na Bélgica, na França e na Algéria (ZUMÁRRAGA et al., 1999; RODRIGUEZ et al, 2004; HADDAD et al, 2001; SAHRAOUI et al., 2009).

O espoligotipo SB0295 já foi descrito na Holanda (HADDAD et al., 2001) e no Brasil (ZANINI et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2004).

O espoligotipo SB0120, também denominado BCG like, é o mais frequente na França, representando 26% das estirpes, também já foi identificado na Bélgica, China, Dinamarca, Iran, Japão, Portugal, Rússia, África do Sul, Espanha, Sri Lanka, Holanda e Algéria. Não foi detectado na Inglaterra e Irlanda (ARANAZ et al., 1996; KREMER et al., 1999; VAN EMBDEN et al., 2000; HADDAD et al., 2001; SAHRAOUI et al., 2009).

O espoligotipo SB0140 é o 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). Já foi descrito no Paraguai, Uruguai, Brasil e México (ZUMÁRRAGA et al., 1999; RODRIGUEZ et al, 2004; COBOS-MARIN et al., 2005).

O espoligotipo SB0881 já foi identificado na França e no Brasil (HADDAD et al., 2001; RODRIGUEZ et al, 2004).

O *Spoligotyping* deve ser sempre utilizado em função de duas características: 1) diferencia o *M. bovis* dos demais integrantes do complexo *M. tuberculosis*; 2) os isolados de *M. bovis* discriminados por essa técnica podem ser comparados entre pesquisadores, através do banco de dados disponibilizado na Internet (www.mbovis.org), facilitando a comparação dos resultados entre laboratórios.

As análises da diversidade alélica mostraram que para as técnicas MIRU e ETR, os loci mais polimórficos foram os MIRU 16, 26, 27, ETR A, B e C, seguidos pelos MIRU 23, 31, 39 e 40 e, por fim, os MIRU 2, 4 e 10 que não apresentaram polimorfismo (Tabela 5 e Quadro 6).

Hilty et al. (2005), estudando isolados de *M. bovis* da República do Chad (África Central) observaram resultados semelhantes, pois os loci mais polimórficos foram MIRU 26 e 27 e ETR A, B e C, classificados como altamente pela mesma análise utilizada no presente estudo. Os mesmos autores também utilizaram o MIRU 16 que, embora tenha sido classificado como moderadamente polimórfico, apresentou resultado inferior aos demais acima citados. Essa mesma análise, comparando os loci das técnicas MIRU e ETR, também já foi aplicada aos isolados humanos de M. tuberculosis (SOLA et al., 2003; SUN et al., 2004a).

No nosso estudo, as análises das amostras de *M. bovis*, com base nos loci MIRU e ETR, apresentaram HGI semelhantes (0,829835 e 0,825337, respectivamente) (Tabela 6). Embora no presente estudo os isolados tenham sido escolhidos com base nos resultados do método *Spoligotyping*, o HGI para esse método também foi calculado, tendo como resultado 0,738381. Resultado semelhante foi verificado por Kremer et al. (2005a), que analisaram o poder discriminatório de nove métodos de tipificação, baseados na PCR, para 90 amostras do complexo *M. tuberculosis* e 10 amostras de micobactérias não pertencentes ao complexo oriundas de 38 países. Os graus de discriminação dos métodos ensaiados, calculados pelo HGI, foram de: 0,998 (*Queens University of Belfast* - QUB-VNTR), 0,995 (MIRU-VNTR), 0,994 (FLiP), 0,987 (*ligation-mediated* PCR - LM-PCR) e 0,982 (*Spoligotyping)*. A diferença do HGI obtido por Kremer et al. (2005a), e aquele verificado no presente estudo, foi decorrente do critério de escolha para inclusão dos isolados aqui utilizados. Em um estudo realizado por Sun et al., em 291 amostras de Singapura (2004b), onde examinaram a diversidade genética do *M. tuberculosis* através do uso do MIRU, o cálculo do HGI para o MIRU-VNTR resultou em 0,975, indicando o alto poder discriminatório desta técnica.

No presente estudo, ao associarmos o método *Spoligotyping* às duas outras técnicas, houve um aumento significativo do poder discriminatório: HGI = 0,930585 (*Spoligotyping* + MIRU) e HGI = 0,931034 (*Spoligotyping* + ETR) (Tabela 6). Para avaliar o desempenho da combinação do MIRU-VNTR com o *Spoligotyping* na detecção das cadeias de transmissão da tuberculose, Oelemann et al. (2007) estudaram 154 amostras pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, na Alemanha. Os autores definiram um grupo de 24 loci de MIRU-VNTR, incluindo um conjunto de 15 loci discriminatórios, proposto anteriormente para ser usado como o método de primeira escolha. Foram utilizados estes conjuntos de 24 e 15-locus com o intuito de melhorar o poder discriminatório da técnica, especialmente quando em associação com o

Spoligotyping, em comparação com o método de RFLP-IS*6110*. Concluíram que o conjunto de 15 ou de 24 MIRU-VNTR combinado com o *Spoligotyping* representa o método de PCR de primeira escolha, com parâmetros operacionais (sensibilidade e especificidade) comparáveis ao método *gold-standard* (RFLP-IS*6110*) para o estudo da transmissão da tuberculose. Isso significa que é bastante razoável supor que essa estratégia de discriminação considerada no presente estudo (Spoligotyping + MIRU) é bastante discriminatória e tem desempenho semelhante àquele do RFLP para *M. tuberculosis*.

A tabela 6 também mostra um HGI de 0,953373 para a combinação das técnicas de MIRU e ETR. Sun et al. (2004a), verificaram que a combinação dessas mesmas técnicas, com o acréscimo dos MIRU 20 e 24, resultou em HGI = 0,994 para isolados humanos de *M. tuberculosis* em Singapura, superior ao obtido RFLP-IS*6110* (HGI = 0,931) ou ao *Spoligotyping* (HGI = 0,923). Chin e Jou (2005), estudando 502 isolados de *M. tuberculosis* de Taiwan também verificaram que a combinação das técnicas de MIRU e ETR melhorou significativamente o HGI.

A tabela 6 mostra que o maior poder discriminatório ocorreu quando as três técnicas foram combinadas (*Spoligotyping* + MIRU + ETR = 0,98051). Em 2003, Sola et al. avaliaram o poder discriminatório desses mesmos três métodos para a genotipagem do complexo *M. tuberculosis,* usadas em associação ou sozinhas. Neste estudo foram utilizadas 103 amostras de diferentes origens geográficas isoladas. Na avaliação individual, os resultados demonstraram que a tipificação pelo MIRU é mais discriminatória (HGI = 0,988) do que pelos os outros dois métodos (*Spoligotyping* – HGI = 0,965; VNTR – HGI = 0,959); sustentando sua utilização na estratégia de genotipagem de grande quantidade de amostras, em associação com o *Spoligotyping*, como melhor alternativa ao RFLP. De acordo com os autores, o resultado encontrado na associação dos três métodos foi excelente, embora não tenham informado o valor do HGI.

A escolha do método depende do poder discriminatório necessário para o objetivo em questão. Considerando as análises realizadas no presente estudo, o método inicial deveria ser *Spoligotyping*, por diferenciar o *M. bovis* dos outros integrantes do complexo *M. tuberculosis*. Como as associações do MIRU e do ETR com o *Spoligotyping* resultaram em HGI praticamente idênticos, depois do *Spoligotyping*, o método ETR parece ser a melhor escolha, pois é mais rápido e econômico do que o MIRU. Finalmente, o MIRU deve ser o último método a ser realizado.

Em relação às análises espaciais, a expectativa era de aumentar a capacidade de detectar agrupamentos espaciais de focos, na medida em que fosse aumentado o poder discriminatório das análises moleculares. Porém, isso não foi verificado no conjunto de análises espaciais realizadas. Provavelmente, isso foi uma conseqüência do número de focos relativamente baixo (66 focos) (Tabela 7). Entretanto, acredita-se que a premissa seja válida.

7 CONCLUSÕES

1. Os MIRU 16, 26 e 27 e os ETR A, B e C foram os que apresentaram maior diversidade alélica, ou seja, maior polimorfismo dentre os ensaiados.

2. Como as associações do MIRU e do ETR com o *Spoligotyping* resultaram em HGI praticamente idênticos, depois do *Spoligotyping*, o método ETR parece ser a melhor escolha, pois é mais rápido e econômico do que o MIRU. Finalmente, o MIRU deve ser o último método a ser realizado.

3. Embora a capacidade de detectar agrupamentos espaciais de focos não tenha sido aumentada na medida em que cresceu o poder discriminatório das análises moleculares, a premissa continua válida.

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 *Mycobacyterium 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.

BAILEY, T.; GATRELL, A. C. **Interactive spatial data analysis**. Harlow: Prentice Hall, 1995. 413 p.

BARKSDALE , L.; KIM, K. Mycobacterium. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p.217-372, 1997.

BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1149-1156, 2003.

BIER, O. Micobactérias. In: **Bacteriologia e imunologia**, 19. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1978. p. 585-610.

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.; 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. **Proccedings of National Academy of Sciences of United States of America,** 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.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Metodos de laboratório de micobacteriologia veterinaria para el aislamiento e identificación de micobactérias**. Buenos Aires: CPZ, 1973. 48 p. (Série de monografías cientificas y tecnicas, 6).

CHIN, P-J.; JOU, R. A modified automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit method for genotyping *Mycobacterium tuberculosis.* **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, p. 325-327, 2005.

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.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY III, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M.-A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature,** v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

COLLINS , D. M.; RADFORD , A. J.; DE LISLE, G. W.; BILLMAN-JACOBE, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 83-94, 1994.

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.; KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emergency Infection Diseases,** n. 4, p. 59-70, 1998.

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.; WILTON, S. D.; FRANCS, B. R. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 27, p. 187-195, 1991.

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.

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.; ZUMARRAGA, 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.

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.

DE LISLE, G. W.; YATES, G. F.; COLLINS, D. M. Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 4, p. 567-571, 1993.

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.

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.

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.; 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.

GAGNEUX, S., SMALL, P. M. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 328-337, 2007.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J-C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; PAUL WHEELER, P. R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B. G.; COLE, S. T.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **PNAS**, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.

GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; BROSCH, R.; PARKHILL, B.; BARREL, B.; COLE, S. T.; HEWINSON, R. G. Genomics of *Mycobacterium bovis*. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1/2, p. 157-163, 2001.

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.

HAAGSMA, J. **Bovine tuberculosis**. Geneve: Office International des Épizooties, 1995. 11 p. (Manual Amendment, 2).

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, 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 IS*987* 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.

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

INSTITUT PASTEUR. **Identification of Mycobacteria.** 2000. Disponível em < http://app.chuv.ch/prasite/index.html > Acessado em 15 de dezembro de 2008.

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.; SCHOULS, L.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, A.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 907-914, 1997.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 781-791, 2003.

KANTOR, I. N. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. Martinez: OPAS/OMS, 1979. 63 p. (Nota tecnica, 11).

KREMER, K.; ARNOLD, C.; CATALDI, A.; GUTIERREZ, M. C.; HAAS, W. H.; PANAIOTOV, S.; SKUCE, R. A.; SUPPLY, P.; VAN DER ZANDEN, A. G.; VAN SOOLINGEN, D. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5628-5638, 2005a.

KREMER, K.; KAM YAN AU, B.; CHI WAI YIP, P.; SKUCE, R.; SUPPLY, P.; MAN KAM, K.; VAN SOOLINGEN, D. Use of Variable-Number Tamdem-Repeat typing to

differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS*6110* Restriction Fragment Length Polymorphism Typing and Spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 314-320, 2005b.

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.

LE FLETCHE, 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.

LEPPER, A. W. D.; COMER, L. A. Naturally occurring mycobacterioses of animals. In: RATLEDGE, C.; STANFORD, J. (Ed.). **The biology of the Mycobacteria**. London: Academic Press, 1983. v. 2, p. 417-521.

MARSHALL, R. B.; WILTON, B. E.; ROBINSON, A. J. Identification of *Leptospira serovars* by restriction endonuclease analysis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 14, p. 163-166, 1981.

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.

NAKAMURA, Y.; CARLSON, M.; KRAPCHO, K.; KANAMORI, M.; WHITE, R. New approach for isolation of VNTR markers. **American Journal of Human Genetic**, 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.

OELEMANN, M. C.; DIEL, R.; VATIN, V.; HAAS, W.; RÜSCH-GERDES, S.; LOCHT, C.; NIEMANN, S.; SUPPLY, P. Assessment of an optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit–Variable-Number Tandem-Repeat typing system combined with Spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 691-697, 2007.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Situación de la tuberculosis bovina en las Americas**. Washington, D. C.: OPS, 1995. (RIMSA 9 Informativo, 26).

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

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2009). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

RODRIGUEZ, C. A. R.; ZUMÁRRAGA, M. J.; OLIVEIRA, E. M. de 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.

ROMANO, M. I.; ALITO, A.; FISANOTTI, J. C.; BIGI, F.; KANTOR, I.; CICUTA, M. E.; CATALDI, A. Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 50, p. 59-71, 1996.

RORING, S. M. M.; SCOTT, A.; BRITTAIN, 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.

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

SAKAMOTO, S. M. **Tipificação de *Mycobacterium bovis* por spoligotyping e por análise de número variável de repetições seriadas (VNTR).** 2001. 41 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SALAMON, H.; SEGAL, M. R.; PONCE de LEON, A.; SMALL, P. Accommodating error analysis in comparison and clustering of molecular fingerprints. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 159-67, 1998.

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

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.

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

SUN, Y-J.; BELLAMY, R.; LEE, A. S. G.; SZE TA NG, RAVINDRAN, S.; WONG, S-Y.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.; PATON, N. I. Use of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1986-1993, 2004b.

SUN, Y-J.; LEE, A. S. G.; SZE TA NG, RAVINDRAN, S.; KREMER, K.; BELLAMY, R.; WONG, S-Y.; VAN SOOLINGEN, D.; SUPPLY, P.; PATON, N. I. Characterization of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5058-5064, 2004a.

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.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

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

TANAKA, M. M.; FRANCIS, A. R. Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS),** v. 103, n. 41, p. 15266-15271, 2006.

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.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

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 BELKUM, A.; SCHERER, S.; VAN LEEUWEN, W.; WILLEMSE D.; VAN ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenza*. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 5017-5027, 1997.

VAN EMBDEN, J. D.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; MCADAM, R.; SHINNICK, T. M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 406-409, 1993.

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 SOOLIGEN, D.; BORGDOFF, M. W.; DE HASS, P. E.; SEBEK, M. M.; VEEN, J.; DESSENS, M.; KREMER, K.; VAN EMBDEN, J. D. A. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 726-736, 1999.

VAN SOOLINGEN, D.; QIAN, L.; DE HAAS, P. E. W.; DOUGLAS, J. T.; TRAORE, H.; PORTAELS, F.; QING, H. Z.; ENKHSAIKAN, D.; NYMADAWA, P.; VAN EMBDEN, J. D. A. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 3234-3238, 1995.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition**. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0. (2002)

VESTAL, A. L. **Procedures for the isolation and identification of Mycobacteria.** Atlanta: US Department of Health, Education and Welfare, 1975. p. 53. (HEW Publications CDC 76-8230).

WARDS, B. J.; COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 227-240, 1995.

WEBSITE hosts the *Mycobacterium bovis* Spoligotype Database. Disponível em: <http://www.mbovis.org > Acessado em 15 de dezembro de 2008.

ZANINI, M. S; MOREIRA, E. C; LOPES, M. T. P; OLIVEIRA, R. S; LEÄO, S. C; FIORAVANTI, R. L; ROXO, E; ZUMARRAGA, 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 spolygotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo; v. 96, n. 6, p. 809-813, Aug. 2001.

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

ZUMARRAGA, M.; 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.